

(19)

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 510 216**

(21) Número de solicitud: 201330400

(51) Int. Cl.:

A23L 1/30

(2006.01)

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22)

Fecha de presentación:

20.03.2013

(43)

Fecha de publicación de la solicitud:

20.10.2014

(56)

Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070207

(71)

Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)****Serrano nº 117
28006 Madrid ES**

(72)

Inventor/es:

**TOMÁS BARBERÁN, Francisco;
SELMA GARCÍA, María Victoria;
BELTRÁN RIQUELME, David;
ESPÍN DE GEA, Juan Carlos y
GARCÍA VILLALBA, Rocío**

(74)

Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

(54)

**Título: MICROORGANISMO CAPAZ DE CONVERTIR ÁCIDO ELÁGICO Y ELAGITANINOS EN
UROLITINAS Y USO DEL MISMO**

(57)

Resumen:

La presente invención se refiere a la identificación por primera vez de microorganismos de origen gastrointestinal humano, que pueden producir urolitinas, a procedimientos de producción de dichos compuestos, al uso de dichos compuestos así producidos en la elaboración de formulaciones alimenticias, farmacéuticas, complementos dietéticos o alimentarios y alimentos funcionales, así como la elaboración de composiciones probióticas mediante la incorporación de microorganismos productores de urolitinas y a un método de aislamiento, de detección y de cuantificación de microorganismos productores de urolitinas basado en el uso de un fragmento de ADN capaz de detectar específicamente los microorganismos productores de urolitinas.

ES 2 510 216 A1

MICROORGANISMO CAPAZ DE CONVERTIR ÁCIDO ELÁGICO Y ELAGITANINOS EN UROLITINAS Y USO DEL MISMO

DESCRIPCIÓN

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención pertenece al campo de la biotecnología y se refiere a un microorganismo que pertenece a una nueva especie bacteriana, que puede producir urolitinas, a un procedimiento para que se produzcan dichos compuestos y a un método de
10 aislamiento, detección y cuantificación de microorganismos productores de urolitinas basado en el uso de un fragmento de ADN capaz de aislar, detectar y cuantificar específicamente el microorganismo productor de urolitinas mencionado. La presente invención permitiría por primera vez desarrollar composiciones alimenticias para humanos o animales, bebidas, complementos dietéticos, cosméticos o composiciones farmacéuticas ricas en urolitinas, en
15 probióticos que contengan dicho microorganismo o en ambos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las urolitinas son compuestos que pueden absorberse en el intestino y que poseen actividad biológica en humanos y otros mamíferos (modulador estrogénico, actividad anti-
20 inflamatoria y anticancerígena, efectos prebióticos, prevención cardiovascular, etc.). Las urolitinas se producen por la microbiota del intestino a partir de elagitaninos y ácido elágico de la dieta (Cerdá y col., Agric. Food Chem., 2005, 53, 5571-5576) que no pueden absorberse a diferencia de las urolitinas. Entre los individuos existe una gran variabilidad en producción de urolitinas siendo algunos individuos altos, medios, bajos o nulos productores
25 de estos compuestos (Cerdá y col., Agric. Food Chem. 2005, 53, 227-235). Se han descrito diversas urolitinas (A, B, C, D, M6, M5, M7, isourolithina A) las cuales difieren entre sí por el número de grupos hidroxilos y posición de los mismos. Varias urolitinas (A, B, C y conjugados de las mismas con ácido glucurónico y sulfato) se han identificado en fluidos biológicos (orina y sangre) y en órganos humanos y animales (rumen de vacas, próstata
30 humano, próstata de ratones, tejido cardíaco...) (Cerdá y col, Eur. J. Nutrition., 2003, 42, 18-28; González-Sarriás y col., Mol. Nut. Food Res., 2010, 54, 311-322; J. Agric. Food Chem., 2009, 57, 5623-5632; J. Agric. Food Chem., 2012. 60, 3068-3077.). Esto pone de manifiesto que las urolitinas son absorbidas en el intestino pasando al torrente sanguíneo y a los diversos órganos ejerciendo un efecto biológico. En consecuencia, tanto la identificación y
35 aislamiento de microorganismos capaces de producir urolitinas y su uso como probióticos,

como los procedimientos capaces de producir estos compuestos son de gran interés, por lo que ha habido diferentes tecnologías orientadas a abordar estas cuestiones.

Así Pottie y colaboradores (Synlett., 2011, 15, 2245-2247 DOI: 10.1055/s-0030-1261203) describen la producción de urolitina M7 mediante síntesis orgánica a partir de 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehído en 8 pasos y con un 48% de rendimiento global. El paso clave es la utilización de una reacción retro Diels-Alder. Sin embargo, esta reacción presenta limitaciones debido a su baja eficiencia, conduce a productos con muy poca diversidad química (únicamente urolitina M7 de entre las urolitinas A, B, C, D, E, M6, M5, M7...) y genera muchos residuos químicos por tanto, su consumo puede presentar problemas de seguridad.

Nawwar y colaboradores (Nawwar y col., 1984, Phytochemistry, 23, 2966-2967) describen algunas plantas (especies de *Tamarix* y *Punica*) que contienen urolitinas, sin embargo su uso es limitado y el proceso de extracción genera extractos complejos con numerosos constituyentes, en los que las urolitinas son un componente minoritario y presentan bajo grado de pureza.

Existen algunos productos de la medicina tradicional que también contienen urolitinas como el Shilajit y Pteropi faeces (Jeong y col., 2000, Planta Med. 66, 76-7). En este caso nos encontramos de nuevo con extractos complejos con numerosos constituyentes en los que las urolitinas son un componente minoritario y con bajo grado de pureza.

Por otro lado, no se ha identificado ningún microorganismo, ni de origen gastrointestinal humano, ni de cualquier otro origen, capaz de producir urolitinas como resultado del metabolismo de elagitaninos, ácido elágico u otros productos naturales o sintéticos. Por tanto, no existen precedentes sobre el empleo de microorganismos para la producción de urolitinas en el cuerpo humano o para la producción de urolitinas a nivel industrial. El uso como probiótico de microorganismos con estas propiedades podría mejorar la producción de urolitinas a nivel intestinal, en animales o humanos, siendo particularmente relevante en aquellos individuos que no son productores de urolitinas o lo son en muy baja proporción, debido a las características de su microbiota. Tampoco se conoce ningún método capaz de aislar y detectar ni de cuantificar microorganismos productores de urolitinas en muestras de heces ni en ningún otro tipo de muestra biológica.

Por lo tanto, el aislamiento y caracterización de microorganismos productores de urolitinas, el desarrollo de un procedimiento de producción de urolitinas de forma eficiente y viable económicamente, con suficiente diversidad química y grado de pureza, así como el diseño de métodos de detección de microorganismos productores de urolitinas son de gran interés, todos estos aspectos constituyen el objeto de la presente invención y su novedad radica en que por primera vez se ha aislado y caracterizado un microorganismo capaz de producir urolitinas como resultado del metabolismo de elagitaninos, ácido elágico u otros productos naturales o sintéticos, se ha puesto a punto un procedimiento de producción de urolitinas y se ha diseñado un procedimiento de aislamiento, detección y cuantificación de microorganismos capaces de producir urolitinas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se enfrenta en primer lugar con el problema del desconocimiento de los grupos microbianos y cepas bacterianas del intestino de humanos u otros mamíferos, implicados en la transformación del ácido elágico y otros compuestos fenólicos de la dieta, en urolitinas.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a microorganismos con capacidad de producir urolitinas. Uno de los cuales ha sido aislado del intestino de humanos sanos y es una nueva especie bacteriana que pertenece al género *Gordonibacter* denominado *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P. Dicho microorganismo tiene un 97% de similitud con la cepa tipo de *Gordonibacter pamelaee* DSM 19378^T que es la única cepa y especie descrita dentro del género *Gordonibacter* (Würdemann y col., 2009. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 59, 1405–1415). No obstante, hasta el momento no se había descrito la capacidad de *G. pamelaee* DSM 19378^T de producir urolitinas, por lo que la producción de urolitinas por este otro microorganismo también constituye un aspecto de la presente invención.

Por lo tanto, un aspecto concreto de la presente invención lo constituyen especies del género *Gordonibacter* capaces de crecer en medios de crecimiento, líquidos y sólidos y en presencia de compuestos fenólicos de la dieta.

La utilización de dichos microorganismos para el desarrollo de procedimientos para la producción de urolitinas constituye otro aspecto de la presente invención. Dichos procedimientos consisten en la transformación de elagitaninos, ácido elágico y derivados, que son compuestos fenólicos presentes en la dieta que no pueden absorberse, en diferentes urolitinas absorbibles en el intestino (urolitina A, B, C, D, E, M6, M5, M7 y

metabolitos relacionados) utilizando o bien el microorganismo objeto de la presente invención (*Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P) o bien *G. pamelaee* DSM 19378^T.

El procedimiento de producción de urolitinas objeto de la presente invención, en comparación con la producción de urolitinas mediante síntesis orgánica, conduce a productos con una mayor diversidad química (ejemplo pentahidroxi-urolitina, tetrahidroxi-urolitina y urolitina C) y con menos residuos químicos por tanto, con mayor seguridad e inocuidad para el consumidor. Además, dicho procedimiento, en comparación con la potencial extracción de urolitinas a partir de ciertas plantas, conduce a urolitinas con mayor grado de pureza y sin el resto de constituyentes que acompañan a los extractos de plantas y otros preparados de medicina tradicional, que son muy complejos y en los que las urolitinas son constituyentes minoritarios.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento de microorganismos productores de urolitinas.

El procedimiento objeto de la presente invención, permite elaborar composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas, probióticas y/o alimentos funcionales enriquecidos en urolitinas fabricadas de forma similar a como ocurre en el intestino de humanos (metabolismo bacteriano de polifenoles de la dieta utilizando un microorganismo aislado del contenido intestinal de individuos sanos). Las urolitinas así producidas, su uso y las composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas, probióticas y/o alimentos funcionales enriquecidos en urolitinas, constituyen otro aspecto de la presente invención.

La producción de urolitinas puede realizarse directamente en la formulación y posteriormente inactivar el microorganismo. Mientras que, la obtención de urolitinas mediante otros procedimientos, (síntesis orgánica o extracción desde productos naturales), solo permite la adición de urolitinas al alimento. Por tanto, en este caso no son necesarios procesos de extracción y purificación de urolitinas ni el uso de disolventes orgánicos que podrían dejar residuos tóxicos en el alimento.

Los microorganismos objeto de la invención (*Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P o bien *G. pamelaee* DSM 19378^T) también pueden usarse como bacterias probiótica en composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones

farmacéuticas, probióticas y/o alimentos funcionales lo que constituye otro aspecto de la presente invención.

Asimismo, otro aspecto de la presente invención se refiere a la posibilidad de elaborar composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas, probióticas y/o alimentos funcionales con la combinación sinérgica (elagitaninos y/o ácido elágico y/o fuentes de estos, junto con el/los microorganismos capaces de producir urolitinas) para proveer al individuo consumidor (animal o humano) del precursor (fuente de elagitaninos y/o elágico) y de la capacidad para producir los metabolitos urolitinas (el/los microorganismos).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la elaboración de composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas, probióticas y/o alimentos funcionales que contengan la combinación sinérgica de los microorganismos de la presente invención y las urolitinas, bien obtenidas por el procedimiento objeto de la presente invención o bien incorporadas a la composición.

En otro aspecto la presente invención proporciona el primer método de aislamiento, identificación y cuantificación de microorganismos productores de urolitinas. Dicho método está basado en la utilización de oligonucleótidos y/o polinucleótidos y/o fragmentos de ácido nucléico, identificados por los inventores, en técnicas de aislamiento, detección y cuantificación específica de microorganismos productores de urolitinas tal como los descritos anteriormente y objeto de la presente invención. Dichos oligonucleótidos, polinucleótidos y fragmento de ácidos nucleicos también constituyen un aspecto de la presente invención. Asimismo, los métodos de aislamiento, detección y cuantificación de microorganismos productores de urolitinas basados en el uso de dichos oligonucleótidos, polinucleótidos y fragmento de ácidos nucleicos constituyen otro aspecto de la presente invención.

De esta manera, la presente invención proporciona un método de cuantificación microbiana que hace posible comprobar la capacidad de producción de urolitinas que tiene un individuo y por tanto identificar individuos con capacidad de producir urolitinas, lo que constituye otro aspecto de la presente invención. Esto puede ayudar a predecir el riesgo de sufrir una variedad de enfermedades y trastornos que pueden estar relacionadas potencialmente con el bajo nivel de urolitinas. Además, puede servir para determinar si existe una relación entre

una enfermedad que posea el individuo y su nivel de microorganismos productores de urolitinas.

La presente invención también hace referencia a la utilización de las composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas, probióticas y/o alimentos funcionales que contienen urolitinas, y/o microorganismos capaces de producir urolitinas, y/o ácido elágico y/o elagitaninos y/o fuentes de estos para la producción de urolitinas in vivo preferentemente para el tratamiento, prevención o mejora de una variedad de enfermedades y trastornos tales como, entre otros, la arteriosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares, cáncer de mama, cáncer de próstata, enfermedades inflamatorias intestinales y síndrome premenstrual u otros.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un sistema de producción de urolitinas y a las urolitinas así producidas por cualquier procedimiento que implique al microorganismo de la presente invención (*Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P) o al microorganismo *G. pamelaee* DSM 19378^T que forma parte del objeto de la presente invención, o cualquier otro microorganismo del género *Gordonibacter* capaz de producir urolitinas, identificado y aislado por cualquiera de los procedimientos objeto de la presente invención. Asimismo el uso de dichas urolitinas en la formulación de composiciones farmacéuticas, complementos dietéticos, composiciones alimenticias, bebidas y/o alimentos funcionales o cualquier otro uso, constituyen otro aspecto de la presente invención.

Las composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas, probióticas y/o alimentos funcionales de la presente invención se puede utilizar tanto para la alimentación y/o el tratamiento de humanos como de animales.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG 1. Cromatograma de los metabolitos producidos por *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P o por *G. pamelaee* DSM 19378^T mediante HPLC-DAD a 305 nm. IS (estándar interno), 1: pentahydroxy-urolithin (pentahidroxi-urolitina o urolitina M5), 2: Ellagic acid (ácido elágico). 3: tetrahydroxy-urolithin (tetrahidroxi urolitina o urolitina M6), 4: urolithin C (urolitina C).

FIG 2. Árbol filogenético de *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P construido con Neighbour Joining (corrección Jukes Cantor). Barra, 1 sustitución por cada 100 posiciones nucleotídicas. El código entre paréntesis representa el número de acceso en el Genbank.

Fig. 3: Distintas urolitinas que pueden producir los microorganismos objeto de la invención (*Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P o por *G. pamelaee* DSM 19378^T) a partir de ácido elágico y/o elagitánicos.

5 **FIG 4.** Cinética de crecimiento de *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P, microorganismo objeto de la invención.

FIG 5. Cinética de producción de urolitinas por *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P, microorganismo objeto de la invención, en un medio líquido que contenga ácido elágico e
10 identificación por HPLC.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la identificación por primera vez de microorganismos de origen gastrointestinal humano, que pueden producir urolitinas, a procedimientos de
15 producción de dichos compuestos, al uso de dichos compuestos así producidos en la elaboración de formulaciones alimenticias, farmacéuticas, complementos dietéticos o alimentarios y alimentos funcionales, así como a la elaboración de composiciones probióticas mediante la incorporación de microorganismos productores de urolitinas y a un método de aislamiento, detección y cuantificación de microorganismos productores de
20 urolitinas basado en el uso de un fragmento de ADN capaz de detectar específicamente los microorganismos productores de urolitinas identificados por los inventores y que también constituye un aspecto de la presente invención.

En la presente invención, la capacidad de producir urolitinas se puede determinar mediante
25 la adición de ácido elágico a un medio de cultivo líquido con una concentración final de 9 µM. A continuación, inoculando en el medio de cultivo el microorganismo diana a una concentración desde 70 a 10⁷ células/mL. Por último, incubando en atmósfera de anaerobiosis (10% H₂; 10% CO₂; 80% N₂) a 37 °C para reproducir las condiciones del intestino. Comparando la concentración de urolitinas con la concentración inicial de ácido
30 elágico podemos calcular la capacidad de producir urolitinas de cada microorganismo.

$$\text{Capacidad de producir urolitinas (\%)} = 100 \times (\text{concentración de urolitinas en el cultivo}) / (\text{concentración inicial de elágico en el cultivo})$$

35 La concentración de urolitinas se puede determinar mediante técnicas rutinarias de HPLC. Se pueden emplear detectores de ultravioleta, en los que las urolitinas muestran un espectro

característico de su modelo de sustitución de hidroxilos y puede además utilizarse para cuantificar las urolitinas frente a patrones (González-Barrio y col., 2011, J. Agric. Food Chem. 59, 1152-1162).

- 5 En la presente invención, los microorganismos con capacidad de producir urolitinas se refieren a un nuevo microorganismo que denominamos *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P, que tiene una capacidad de transformar ácido elágico en urolitinas de 100 % cuando se mantiene a una determinada temperatura durante 162 horas. Alternativamente, otro microorganismo denominado *G. pamelaee* DSM 19378^T que tiene una capacidad de
- 10 transformar ácido elágico en urolitinas cuando se mantiene a una determinada temperatura y cuya capacidad de producir urolitinas también forma parte de la presente invención.

En un procedimiento más específico, el nuevo microorganismo de la presente invención (*Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P) que tiene una capacidad de producir urolitinas puede

15 seleccionarse mediante un cribado. Específicamente, una muestra (por ejemplo, heces) que posiblemente contiene microorganismos productores de urolitinas se siembra en un medio de crecimiento sólido (ej. DRCM Oxoid), se incuba en anaerobiosis a 37 °C y tras 72 h, las colonias aisladas se sub-cultivan en un medio de crecimiento líquido (ej. caldo cerebro corazón) con elágico y se monitoriza la transformación de ácido elágico en urolitinas.

20 Ejemplos de muestras que pueden contener microorganismos productores de urolitinas son heces y contenidos del tracto digestivo (colon descendente, ciego...) de un sujeto humano o animal productor de urolitinas. La muestra de heces empleada es preferiblemente homogeneizada en un diluyente usando una bolsa con filtro y un homogeneizador de palas.

25 Una de las bacterias que tienen la capacidad de producir urolitinas y que pertenece al género *Gordonibacter* se ha obtenido mediante el procedimiento mencionado anteriormente. De acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes, un cultivo de la bacteria que tiene la capacidad de producir urolitinas y que pertenece al género

30 *Gordonibacter* y denominada *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P se ha depositado en la Colección Alemana de Cultivos Tipo (DSMZ), 38124 Braunschweig, Alemania, el 25 de Octubre de 2012, correspondiéndole el número de depósito DSM 26536. La filogenia y las propiedades bioquímicas de *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P DSM 26536 se describirá a continuación.

35

La secuencia de nucleótidos del gen que codifica el ARNr 16S de *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P con una longitud de 1477 pb (SEQ ID. NO: 1), se determinó mediante amplificación directa por PCR del gen ARNr 16S, secuenciación parcial del mismo (con lecturas en las dos direcciones). Se realizó el análisis conjunto de las secuencias e identificación de las especies más relacionadas filogenéticamente. Como resultado, se encontró que esta cepa bacteriana tenía una homología del gen ARNr 16S de 97 % con respecto a otra cepa conocida como *Gordonibacter pamelaeeae* cepa tipo DSM 19378 (N ° de acceso: AM886059) que pertenece al género *Gordonibacter*.

Las propiedades bioquímicas del microorganismo de la presente invención resultaron diferentes al de las especies más cercanas filogenéticamente incluyendo *Gordonibacter pamelaeeae* DSM 19378^T. También se observaron propiedades bioquímicas comunes a las dos especies de *Gordonibacter* (*Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P y *Gordonibacter pamelaeeae* DSM 19378^T) que las hacen distintas de las otras 3 especies más cercanas filogenéticamente (*Paraeggerthella hongkongensis* HKU10; *Eggerthella lenta* ATCC 25559; *Eggerthella sinensis* HKU14). Por tanto, la cepa *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P difiere de la única cepa y especie conocida del genero *Gordonibacter* así como de las otras tres especies más cercanas filogenéticamente.

Las composiciones alimenticias/ bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas o probióticas de la presente invención que contienen un microorganismo que tiene una capacidad de producción de urolitinas se pueden emplear como un potenciador del nivel de urolitinas en el organismo, la sangre, el intestino (por ejemplo, el intestino grueso), etc, con el propósito de tratar, mejorar, prevenir, etc. una variedad de enfermedades y trastornos tales como arteriosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares, cáncer de mama, cáncer de próstata, enfermedades inflamatorias intestinales y síndrome premenstrual. En particular, si las composiciones alimenticias/bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas o probióticas se aplican a un individuo humano que no tiene ninguna capacidad de producción de urolitinas (no productor) o un individuo humano que tiene una baja capacidad de producción de urolitinas, una variedad de enfermedades y trastornos donde las urolitinas son eficaces pueden prevenirse en la vida cotidiana. Además, la composición se aplica preferentemente a los sujetos humanos de mediana edad o ancianos, que tienen un mayor riesgo de sufrir las enfermedades crónicas mencionadas.

No se impone una limitación particular sobre el modo de uso de los microorganismos de la presente invención que tienen una capacidad de producción de urolitinas, y cualquiera de las células viables o células térmicamente desnaturalizadas (células muertas donde se extraen las enzimas productoras de urolitinas sin alteración de las mismas) pueden utilizarse. Además, se puede usar un producto liofilizado del mismo, un producto de cultivo (por ejemplo, sobrenadante de cultivo que contenga urolitinas sin contener el microorganismo) etc. En particular, dado que la capacidad de transformación de ácido elágico en urolitinas se debe a una o varias enzimas del microorganismo, los microorganismos se emplearan preferiblemente en un estado en el que se inhiba la inactivación de sus enzimas.

Las composiciones alimenticias/bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas o probióticas de la presente invención pueden contener además ácido elágico, junto con el microorganismo para proveer al individuo consumidor (animal o humano) del precursor (ácido elágico) y de la capacidad para producir los metabolitos urolitinas (el microorganismo). Teniendo en cuenta que a partir de ciertos elagitaninos de la dieta se libera ácido elágico en el tracto gastrointestinal, se pueden emplear en lugar de ácido elágico, compuestos tales como la punicalagina de la granada, los elagitaninos de las nueces, las fresas, las frambuesas, plantas medicinales, así como tejidos vegetales ricos en elagitaninos (hoja de roble, bellotas etc). Alternativamente, también se pueden usar metabolitos intermedios de conversión del ácido elágico a urolitina A, por ejemplo, urolitina M5, urolitina D, etc. Esta combinación sinérgica (elagitaninos y/o ácido elágico y/o fuentes de estos, junto con el microorganismo) proporciona un mejorador más potente del nivel de urolitinas. Los elagitaninos y/o ácido elágico utilizado en la presente invención puede ser tanto un producto comercial como un producto sintético o un extracto natural. Alternativamente, también se puede usar un producto natural que contenga una gran cantidad de elagitaninos o uno de sus productos procesados. Los ejemplos específicos de los productos que contienen una gran cantidad de elagitaninos incluyen la granada, nueces, fresas, castañas, moras, frambuesas, etc. Ejemplos del producto procesado incluyen el zumo de granada y el zumo de fresa.

No se impone una limitación estricta de la dosis de urolitinas en las composiciones alimenticias/ bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas o probióticas de la presente invención que contengan un microorganismo que tiene una capacidad de producir urolitinas. Preferiblemente, la dosis está predeterminada para alcanzar el efecto deseado de acuerdo con diferentes modos de uso, por ejemplo, el individuo objetivo y las

enfermedades diana y trastornos. La dosis diaria de microorganismo (como reducido a células viables) es preferiblemente de 10^5 células a 10^{10} células, en particular preferiblemente de 10^8 células a 10^{10} células. El contenido de polifenoles, punicalagina y ácido elágico de la composición es preferentemente de 500 a 2.000 mg/litro más
5 preferiblemente desde 1.500 hasta 2.000 mg/litro.

La composición de la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral. Sin embargo, la administración oral de la composición es la preferible. En un ejemplo de administración, la composición que contiene como ingrediente activo un microorganismo que
10 tiene una capacidad de producción de urolitinas se mezcla con un portador farmacéutico no tóxico sólido o líquido, seleccionado dependiendo del método de administración (por ejemplo, administración oral, administración rectal, o por inyección), para producir con ello una preparación farmacéutica común.

Ejemplos de la preparación farmacéutica antes mencionada incluyen preparaciones sólidas tales como tabletas, gránulos, polvo, y cápsulas, preparaciones líquidas tales como soluciones, suspensiones, y emulsiones, jarabes y preparaciones liofilizadas. Estas preparaciones pueden producirse a través de un método de fabricación común. Ejemplos del vehículo farmacéutico no tóxico incluyen almidón, dextrina, glicérido de ácido graso,
20 polietilenglicol, almidón de hidroxietilo, etilenglicol, aminoácido, agua, gelatina, albúmina, y solución salina fisiológica. Si es necesario, la preparación apropiada puede contener aditivos comunes tales como un estabilizador, un agente humectante, un emulsionante, un aglutinante, un agente de tonicidad, y un excipiente.

Las composiciones alimenticias/bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas o probióticas de la presente invención se pueden usar sin modificar o junto con una variedad de componentes nutricionales. Las composiciones alimenticias/bebidas de la presente invención pueden utilizarse como un alimento saludable o material alimenticio con el propósito de elevar el nivel de urolitinas in-vivo, o útiles para la mejora, prevención,
30 etc. de enfermedades o trastornos crónicos como arteriosclerosis, cáncer de mama, cáncer de próstata, enfermedades inflamatorias intestinales y síndrome premenstrual. Estos alimentos y bebidas, o sus contenedores, pueden tener una etiqueta que indique tales efectos. Específicamente, cuando se emplea como un alimento o bebida, la composición de la presente invención debe estar adecuadamente mezclada con un aditivo que puede
35 añadirse a un alimento o bebida, y la mezcla se puede preparar, a través de medios convencionales, de forma adecuada para poder comerse o beberse, por ejemplo, gránulos,

partículas, comprimido, cápsula, o pasta. La composición se puede añadir a una variedad de alimentos, por ejemplo, productos cárnicos procesados (por ejemplo, jamón y salchichas), los productos de pescado (por ejemplo, kamaboko y chikuwa), pan, productos de confitería, mantequilla, leche en polvo y leche fermentada, o se puede añadir a bebidas tales como

5 agua, zumo y néctar de frutas, mermelada, leche, refrescos, bebidas a base de té o sus combinaciones. Tal como se utiliza aquí, el término "alimento o bebida" abarca alimentos también para animales.

Teniendo en cuenta que el microorganismo de la presente invención tiene una capacidad de

10 actuar sobre ácido elágico convirtiéndolo en urolitinas, las urolitinas se pueden producir in-vitro con alta eficiencia. No se impone limitación particular sobre el modo en que se usa el microorganismo para producir urolitinas, y se pueden utilizar cualquiera de las células viables o células térmicamente desnaturalizados (células muertas) o sus enzimas. Además se puede utilizar, un producto liofilizado del mismo, un producto de cultivo (por ejemplo,

15 sobrenadante de cultivo), un producto de células tratadas, etc. En particular, dado que la capacidad de transformación en urolitinas se debe a las enzimas microbianas, el microorganismo se emplea preferiblemente en un estado que se inhiba la inactivación de sus enzimas. En comparación con la síntesis orgánica, el microorganismo de la presente invención conduce a la producción de urolitinas con una mayor diversidad química y con

20 menos residuos potencialmente peligrosos para la salud, por tanto con mayor seguridad e inocuidad para el consumidor.

En un procedimiento de producción concreto, el ácido elágico se añade a un medio de cultivo a una concentración de 9 μM y el microorganismo de la presente invención que tiene

25 una capacidad de producción de urolitinas se inocula en el medio a distintas concentraciones desde 70 a 10^7 células/mL de medio, seguido de cultivo anaerobio a 37°C durante 72 horas o más, para producir con ello urolitinas. Para el medio de cultivo, se pueden añadir componentes adecuados, como sacáridos y fuente de nitrógeno. Sin embargo, no se recomienda el uso de un componente que inhiba la capacidad de

30 producción de urolitinas o la proliferación del microorganismo de la presente invención que tiene una capacidad de producir urolitinas. Ejemplos de los componentes que pueden añadirse al medio incluyen peptona, peptona tripticasa, extracto de levadura, hemina, histidina, vitaminas, como la vitaminas K, L-cisteína, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 , MgSO_4 , glúcidos como la fructosa y fibras. Excepto ácido elágico y arginina, el medio

35 de cultivo de la presente invención puede tener una composición de, por ejemplo, el medio Wilkins-chalgren, medio basal para anaerobios, el medio BHI, el medio DRCM, etc.

El ácido elágico, utilizado como sustrato, puede ser un producto comercial, un producto sintético o un extracto natural obtenido de frutas o plantas. Alternativamente, también se puede usar un material natural que contenga una gran cantidad de ácido elágico o uno de sus productos procesados. También alternativamente, se puede emplear ácido elágico en forma de elagitaninos, tales como punicalagina, estrictinina, pedunculagina, geraniina u otros extractos de elagitaninos procedentes de frutas, hojas u otras partes de las plantas. En este caso, se pueden utilizar medio a pH neutro para liberar el ácido elágico de estos compuestos.

En lugar de realizar el cultivo con el microorganismo de la presente invención que tiene una capacidad de producir urolitinas, se pueden utilizar las enzimas procedentes del microorganismo y que tienen capacidad de producir urolitinas. No se impone limitación particular sobre el modo de uso del preparado enzimático. Ejemplos específicos del modo de incluir el uso de un producto de cultivo son, el uso de un concentrado o gránulos de un producto de cultivo obtenido a través de un proceso de concentración, tal como centrifugación o filtración con membranas, el uso de células en reposo, el uso de células secas, el uso de células lisadas, el uso de un extracto bruto de enzimas, el uso de solución de la enzima purificada en suspensión o en polvo.

No se impone limitación particular sobre las condiciones de purificación y el grado de purificación de las enzimas, y se puede emplear una técnica de purificación convencional. En un procedimiento de purificación enzimático, se cultiva un microorganismo que tiene capacidad de transformación a urolitinas, y las células se separan del producto de cultivo por medios de separación tales como centrifugación, separación por membrana orgánica, o separación por membrana inorgánica. Cuando el sobrenadante de cultivo contiene las enzimas responsables de la producción de urolitinas, el sobrenadante recuperado se puede emplear como un extracto bruto de enzimas. En el caso de que las células contengan las enzimas responsables, las células se pueden romper químicamente o físicamente por medio de un homogeneizador, por ultrasonidos u otros métodos. Alternativamente, las células se pueden tratar enzimáticamente con una enzima de lisis de la pared celular, para proporcionar así un extracto intracelular, que se puede emplear como un extracto bruto de enzimas. Este extracto se pueden tratar mediante, por ejemplo, desplazamiento salino con sulfato de amonio, diálisis, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción y cromatografía de afinidad, en combinación apropiada, para proporcionar así una solución de la enzima de alta pureza.

El microorganismo que tiene capacidad de producir urolitinas o las enzimas procedentes del microorganismo que tiene una capacidad de producir urolitinas pueden inmovilizarse mediante una técnica de inmovilización convencional. No se impone limitación particular en la técnica de inmovilización, y los ejemplos de la técnica de inmovilización incluyen portador de unión, reticulación, y atrapamiento. Ejemplos de portador de unión incluyen unión covalente, enlace iónico, y la adsorción física; ejemplos de reticulación incluyen el método del glutaraldehído, y ejemplos de atrapamiento incluyen atrapamiento en forma de celosía y atrapamiento en microcápsula. Ejemplos más específicos incluyen la adsorción sobre carbón activado, serrín, etc; unión a CM-celulosa, P-celulosa, celulosa DEAE, ECTEOLA-celulosa, etc; reticulación con glutaraldehído, diisocianato de tolueno, etc, y el atrapamiento con acrilamida, kappa.-carragenano, ácido algínico, gelatina, acetato de celulosa, etc. La bacteria o enzimas inmovilizadas así pueden emplearse en un método convencional (por ejemplo, en columna, etc) y en proceso discontinuo o continuo.

Para la separación de las urolitinas producidas en un medio de cultivo que contenga ácido elágico y el microorganismo de la presente invención, incubado a la temperatura y la atmósfera adecuada, se pueden emplear procesos de centrifugación del medio de cultivo para la recuperación de las mismas en el sobrenadante. El sobrenadante del medio de cultivo puede someterse a un proceso de extracción con plasma o de separación / purificación convencional tales como cromatografía en columna o la extracción con disolvente orgánico, así separamos las urolitinas del medio de cultivo. El medio de cultivo así obtenido se puede adsorber sobre una columna polimérica no-iónica o de intercambio iónico, seguido de elución con metanol u otros disolventes y tampones, a fin de obtener un producto purificado de urolitinas.

Para la producción de los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención, se emplea como diana la secuencia de nucleótidos de *Gordonibacter* CEBAS 1/15P DSM 26536 que los presentes inventores obtuvieron a través de la amplificación directa por PCR del gen ARNr 16S, que es altamente fiable para estudios filogenéticos (SEQ. ID NO: 1). Puesto que el análisis de los fragmentos requiere medios de PCR o similar, se empleó el ADN en lugar de un ARN.

En el diseño de los fragmentos de ácidos nucleicos de la presente invención, la secuencia de nucleótidos del gen ARNr 16S de *Gordonibacter* CEBAS 1/15P DSM 26536 (SEQ. ID NO: 1), se alinea con la secuencia del gen ARNr 16S de *Gordonibacter pamelaee* DSM

19378^T que tiene una capacidad de producir urolitinas, así como con la de bacterias estrechamente relacionadas filogenéticamente. Específicamente, la alineación del gen ARNr 16S se lleva a cabo mediante el programa Mega4 utilizando las bases de datos (EMBL) donde están disponibles las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias estrechamente relacionadas a *Gordonibacter*, que pertenecen a la familia Coriobacteriaceae (*Paraeggerthella hongkongensis* HKU10 (AY288517); *Eggerthella lenta* ATCC 25559 (AF292375); *Eggerthella sinensis* HKU14 (AY321958)) y que no son productoras de urolitinas. Esta comparación permite identificar un fragmento de la secuencia del gen ARNr 16S que presenta mayor homología para *Gordonibacter* CEBAS 1/15P DSM 26536 y *Gordonibacter pamelaee* DSM 19378^T y mayor diferencia con el resto de bacterias cercanas filogenéticamente, este fragmento tiene una longitud de 689 nucleótidos (SEQ. ID NO: 2). A partir de este fragmento (SEQ ID NO: 2) se diseñan mediante el programa Primer express, cuatro cebadores, dos directos y dos reversos, identificados como SEQ. ID NO: 3, 4, 5 y 6 y una sonda TaqMan identificada como SEQ. ID NO: 7. El fragmento de ácido nucleico que puede hibridar específicamente con el ADN y / o ARN de las bacterias del genero *Gordonibacter* no se limita a las secuencias de nucleótidos diseñadas así (SEQ. ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 y 7), y los expertos en la técnica pueden concebir otros equivalentes sobre la base del conocimiento técnico común. Ejemplos de tales equivalentes incluyen un fragmento de ácido nucleico que tenga una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencias diseñadas así (SEQ. ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 y 7), y un fragmento de ácido nucleico que tenga una secuencia de nucleótidos homóloga a cualquiera de las secuencias anteriores y que es funcionalmente equivalente al fragmento de ácido nucleico anterior. Los ejemplos del fragmento de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos homóloga y que es funcionalmente equivalente incluyen los siguientes fragmentos de ácido nucleico (a) a (c):

(a) un fragmento de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos representada por la secuencia de nucleótidos SEQ. ID NO: 2 ó 3 ó 4 ó 5 ó 6 ó 7 o una secuencia complementaria de nucleótidos, donde una a varias bases, preferiblemente de 1 a 10 bases, están suprimidas, sustituidas o añadidas;

(b) un fragmento de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de 90 % o superior, preferiblemente 95 % o más, más preferiblemente 99 % o más, a la secuencia de nucleótidos de SEQ. ID NO: 2 ó 3 ó 4 ó 5 ó 6 ó 7 ó una secuencia complementaria de nucleótidos; y

(c) un fragmento de ácido nucleico que hibrida en condiciones restrictivas con un fragmento de ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ. ID NO: 2 ó 3 ó 4 ó 5 ó 6 ó 7 ó una secuencia complementaria de nucleótidos.

- 5 Estos ejemplos se pueden emplear en la detección, identificación y cuantificación de los microorganismos diana capaces de producir urolitinas.

La identidad de una secuencia de nucleótidos se calcula por medio de un programa de análisis de homología, GENETYX (R).

10

Los fragmentos de ácidos nucleicos diseñados pueden sintetizarse artificialmente, de acuerdo con las secuencias de nucleótidos de los mismos, por medio de un sintetizador de ADN. La especificidad de los fragmentos de ácido nucleico se investiga mediante el uso de dos fragmentos de ácido nucleico como cebadores (SEQ. ID NO: 3 y 5) o (SEQ. ID NO: 4 y 6) o combinaciones de ambos y el tercero como sonda (SEQ. ID NO: 7) y confirmado por el uso de, como índices, la presencia de amplicones específicos como cualquiera de los identificados como (SEQ. ID NO: 8 ó 9 ó 10 ó 11) o sus complementarios u homólogos o no frente a cepas estrechamente relacionadas *Paraeggerthella hongkongensis* HKU10 (AY288517), *Eggerthella lenta* ATCC 25559 (AF292375), *Eggerthella sinensis* HKU14 (AY321958), *Adlercreutzia equolifaciens* FJC-B9 (AB306661), *Asaccharobacter celatus* do03 (AB266102), *Enterorhabdus caecimuris* B7 (DQ789120), *Enterorhabdus mucosicola* Mt1B8 (AM747811), *Denitrobacterium detoxificans* NPOH1 (U43492), *Cryptobacterium curtum* ATCC 700683 (AB019260), *Slackia faecicanis* CCUG 48399 (AJ608686), *Slackia piriformis* YIT 12062 (AB490806), *Slackia equolifaciens* DZE (EU377663), *Slackia isoflavoniconvertens* HE8 (EU826403), *Slackia exigua* ATCC 700122 (AF101240), *Slackia heliotrinireducens* ATCC 29202 (AF101241), *Collinsella intestinalis* RCA56-68 (AB031063), *Collinsella stercoris* RCA55-54 (AB031061), *Collinsella tanakaei* YIT 12063 (AB490807), *Collinsella aerofaciens* JCM 10188 (AB011816), *Coriobacterium glomerans* DSM 20642 (X79048). Como resultado, la especificidad se confirma.

30

Puesto que el fragmento de ácido nucleico (SEQ. ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 y 7) de la presente invención tiene especificidad para microorganismos del género *Gordonibacter* que tienen una capacidad de producir urolitinas, el microorganismo que tiene una capacidad de producir urolitinas puede detectarse, identificarse, y cuantificarse específicamente mediante PCR con el ADN o ARN recuperado a partir de heces humanas o animales o el contenido del tubo digestivo, o por otros medios tales como FISH (hibridación fluorescente in situ) o

35

similares. A través de la cuantificación del microorganismo que tiene una capacidad de producir urolitinas, la capacidad de producción de urolitinas que posee un individuo se puede comprobar fácilmente, por lo que el riesgo de sufrir una variedad de enfermedades y trastornos que pudieran estar relacionadas potencialmente con el bajo nivel de urolitinas
5 tales como arteriosclerosis, cáncer de mama, cáncer de próstata, enfermedades inflamatorias intestinales puede determinarse. Por lo tanto, medidas de prevención (por ejemplo, la administración de la composición de la presente invención) podrían llevarse a cabo en individuos que presenten baja o nula capacidad de producción de urolitinas. Además, a través de, por ejemplo, la administración de la composición de la presente
10 invención, un individuo que ya sufre una enfermedad y que no tiene o tiene baja capacidad de producción de urolitinas podría tratarse o mejorarse.

El análisis por PCR convencional o por PCR a tiempo real o de Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se pueden realizar a través de, por ejemplo,
15 los siguientes pasos:

- (1) una etapa de extracción del ADN o ARN que contiene una muestra de heces;
- (2) una etapa de realización de la reacción de PCR o RT-PCR mediante el uso de uno
20 o más de los fragmentos de ácido nucleico mencionados anteriormente (SEQ. ID NO: 3, 4, 5, 6 y 7), y
- (3) una etapa de detección de un fragmento de ADN amplificado en el paso (2) (SEQ. ID NO: 8 ó 9 ó 10 ó 11). Cuando la reacción de amplificación se realiza utilizando
25 como cebadores los oligonucleótidos (SEQ. ID NO: 3 ó 4 ó 5 ó 6) en combinación con el ADN extraído de la muestra (ADNc en el caso de que el molde sea RNA), se puede conseguir un fragmento de ADN (producto de la reacción de PCR) (SEQ. ID NO: 8 ó 9 ó 10 ó 11) específico para bacterias diana que pertenecen al género *Gordonibacter* y que producen urolitinas. A través de la electroforesis del fragmento de ADN obtenido
30 de este modo, las bacterias diana que pertenecen al género *Gordonibacter* pueden detectarse e identificarse específicamente de acuerdo con la presencia o ausencia de la banda correspondiente.

La detección del producto de la reacción de PCR también se puede realizar mediante el
35 etiquetado del producto de PCR con un colorante intercalante fluorescente, tal como SYBR (R) Green I y la medición de la intensidad de fluorescencia en cada etapa de PCR. Puesto

que el colorante intercalante aumenta la intensidad de fluorescencia a través de intercalación con un ácido nucleico de doble cadena, el producto de la PCR formado a través de la amplificación puede detectarse correctamente. Entre colorantes intercalantes, se puede emplear entre otros SYBR (R) Green I.

5

A través de la determinación del número de ciclos de PCR en el momento en que la intensidad de fluorescencia (concentración de ADN molde) ha alcanzado un nivel predeterminado (denominado en lo sucesivo valor C_T), la bacteria diana contenida en la muestra puede cuantificarse, detectarse, o identificarse. Este análisis también se puede

10 realizar mediante el uso de sondas fluorescibles para lo que se diseñó una sonda TaqMan (SEQ. ID NO: 7). Una sonda TaqMan o Molecular Beacon es una sonda en la que un colorante fluorescente y un inhibidor de la fluorescencia están unidos a un oligonucleótido que tiene una homología con una secuencia interna de una región que se amplifica mediante PCR. La sonda se emplea adicionalmente en la PCR junto a los cebadores (SEQ.

15 ID NO: 3, ó 4, ó 5, ó 6). Dado que la fluorescencia se emite en función de la reacción de amplificación de PCR, a través de la interacción entre el colorante fluorescente y el inhibidor unido a la sonda, el producto de la PCR formado a través de la amplificación se puede monitorizar mediante la medición de la intensidad de fluorescencia en cada etapa de PCR.

20 Las bacterias diana contenidas en la muestra, que pertenece al género *Gordonibacter*, pueden cuantificarse, detectarse o identificarse por medio de una curva de calibración entre los valores C_T y el logaritmo de la concentración de células determinado mediante recuento en placa de cultivo o un método similar. Específicamente, para dibujar una curva de calibración se representan a lo largo del eje vertical los valores C_T , y a lo largo del eje

25 horizontal se representan los logaritmos de las concentraciones de células obtenidas mediante recuento. De esta manera, a cada valor de C_T obtenido a través de la PCR le corresponde una concentración de células de la curva de calibración, por lo que la bacteria diana contenida en la muestra que pertenece al género *Gordonibacter* puede cuantificarse, detectarse o identificarse.

30

Las bacterias que pertenecen al género *Gordonibacter* pueden cuantificarse por PCR utilizando diluciones seriadas del ADN o ARN (ADNc) molde. En la cuantificación por PCR, se emplea preferiblemente la PCR a tiempo real aunque pueden emplearse otros métodos tales como los mencionados anteriormente. Mediante el seguimiento del producto de PCR

35 formado a través de la amplificación por PCR y la determinación del número de ciclos de

PCR cuando la concentración de ADN ha alcanzado una cierta cantidad, puede cuantificarse una bacteria contenida en la muestra que pertenezca al género *Gordonibacter*.

5 Los fragmentos de ácidos nucleicos SEQ. ID NO: 3, 4, 5 y 6 de la presente invención se emplean como cebadores en la PCR, pero también se pueden emplear como una sonda en combinación con un par de cebadores universales conocidos, oligonucleótido, etc.

10 Ejemplos de la utilización de los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención (SEQ ID NO: 2 ó 3 ó 4 ó 5 ó 6, ó, 7, ó 8, ó 9, ó 10, ó 11) para construir una sonda incluyen entre otros, la hibridación in situ y la hibridación dot blot. Como método de análisis rápido es preferible la hibridación in situ, ya que no requiere el paso de extracción del ácido nucleico contenido en una muestra. Más concretamente, se puede utilizar el método FISH, empleando un fragmento de ácido nucleico marcado con un tinte fluorescente.

15 Específicamente, el método FISH se puede realizar a través de los siguientes pasos: (1) una etapa de fijación la muestra con formaldehído o formalina; (2) una etapa de aplicación de la muestra fijada en un portaobjetos de vidrio o filtro de membrana, (3) una etapa de realización de la hibridación con un fragmento de ácido nucleico marcado con el colorante fluorescente, (4) una etapa de lavado del fragmento de ácido nucleico que queda después
20 de la hibridación y no se une específicamente, y (5) una etapa de la observación visual de los resultados de la hibridación bajo una microscopio de fluorescencia o por medio de una cámara de recuento o un aparato similar para tomar una imagen de la misma.

25 Cuando las bacterias diana que pertenecen al género *Gordonibacter* están presentes en la muestra, su ADN se hibrida con el fragmento de ácido nucleico empleado, y la señal positiva se obtiene después de la hibridación. Sobre la base de la señal positiva, las bacterias del género *Gordonibacter* pueden aislarse, detectarse específicamente o identificarse. A través del conteo las células marcadas, se puede llevar a cabo la cuantificación. El método de aislamiento de bacterias productoras de urolitinas mediante la utilización como sonda, de
30 alguno de los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención (SEQ ID NO: 2 ó 3 ó 4 ó 5 ó 6, ó, 7, ó 8, ó 9, ó 10, ó 11) también constituye otro de los aspectos de la presente invención.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

35 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores. Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de

patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no deben ser interpretados en sentido limitativo del alcance de la invención que aquí se reivindica. Por tanto los ejemplos descritos no deben limitar el campo de aplicación de la misma.

5

EJEMPLO 1. Aislamiento y recuperación de un microorganismo que tiene una capacidad de convertir ácido elágico y elagitaninos en urolitinas

En primer lugar se obtuvieron heces frescas excretadas por individuos sanos productores de urolitinas. Estas heces se diluyeron 1/10 peso/volumen, en un diluyente (1% lab-lemco powder; 1% peptona, 0.5% NaCl, 0.05% de hidrocloreuro de L-cisteína y 20% de glicerol). A
10 continuación se homogeneizó utilizando bolsas con filtro y un homogeneizador de paletas. El residuo de la suspensión se eliminó a través del filtro de la bolsa. La suspensión resultante se diluyó en el mismo diluyente y se aplicó una alícuota (0.1 mL) de la solución a placas de agar que contenían (1.6% peptona, 0.7% extracto de levadura, 0.5% NaCl, 0.1% almidón,
15 0.1% Dextrosa, 0.1% piruvato sódico, 1% arginina, 0.05% succinato de sodio, 0.05% hidrocloreuro de L-cisteína, 0.04% bicarbonato sódico, 0.5% pirofosfato férrico, 0.0005% hemina, 0.00005 % vitamina K, 0.05% tioglicolato de sodio, 0.1% ditiotreitól y 20% agar). Las placas se incubaron a 37 °C durante 72 horas en una cabina de anaerobiosis, para con ello formar colonias. Las colonias así obtenidas se inocularon individualmente en un medio
20 líquido que contenía ácido elágico disuelto a una concentración final de 30 µM, seguido de incubación a 37 °C durante 72 horas bajo una mezcla de gas (N₂: H₂: CO₂ = 80:10:10).

La determinación de la concentración de urolitinas en los cultivos líquidos resultantes de la incubación descrita en el párrafo anterior se realizó utilizando un equipo de HPLC (Agilent
25 1200) equipado con dos detectores en serie: detector UV-Vis (longitudes de onda 280, 305 y 360 nm) y un detector de masas de cuadrupolo simple (Agilent 6120). Se utilizó una columna C18 Poroshell 120 (3 x 100 mm, 2.7 µm de tamaño de partícula) que se mantuvo a una temperatura de 25 ° C. Como fases móviles se empleó agua con 1% de ácido fórmico (fase A) y acetonitrilo (fase B) a un flujo de 0.5 mL/min y un volumen de inyección de 5 µL de
30 muestra. Los cromatogramas de UV se obtuvieron a 360 nm y 305 nm. Las urolitinas se identificaron en función de su espectro de UV-Vis y su masa molecular y cuando fue posible por la comparación con estándares conocidos. El ácido elágico se cuantificó con su estándar a 360 nm, la urolitina C con su estándar a 305 nm y el resto de urolitinas se cuantificaron a 305 nm usando urolitina A como patrón externo. El perfil cromatográfico se muestra en la
35 Figura 1.

Se determinó la concentración de urolitinas de cada una de los cultivos mediante HPLC siguiendo el procedimiento indicado, para así seleccionar un microorganismo productor de urolitinas que resultó ser una bacteria flagelada, cocobacilar, Gram-positiva con alta capacidad de producción de urolitinas y que se denominó CEBAS 1/15P DSM26536.

5

EJEMPLO 2. Identificación, análisis genético y de propiedades bioquímicas de los microorganismos que tienen capacidad de producir urolitinas

Para caracterizar el microorganismo productor de urolitinas seleccionado en el ejemplo anterior se realizó una amplificación mediante PCR del ARN ribosómico 16S. En dicha
10 reacción se utilizó como ADN molde, una purificación de ADN genómico de la bacteria aislada en el Ejemplo 1 (CEBAS 1/15P), y como cebadores se utilizaron el par de cebadores 616V (forward) (SEQ ID. NO: 12) and 699R (reverse) (SEQ ID. NO: 13), así como el par de cebadores P609D (SEQ ID. NO: 14) and P1525R (SEQ ID. NO: 15) descritos por otros
15 autores (Arahal y col., 2008 Int. Microbiol., 11, 33–39; Lucena y col., 2010, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60, 1844–1848) y recogidos en la Tabla 1. La secuencia obtenida correspondía a la secuencia casi completa del gen ARNr 16S, tenía una longitud de 1477 nucleótidos. Se realizó un análisis comparativo de la secuencia obtenida frente a secuencias de gen ARNr 16S de otras bacterias y se identificaron las especies más cercanas filogenéticamente
20 utilizando el servidor Ez-Taxon-e, que realiza análisis BLAST y megaBLAST. El resultado se muestra recogiendo la extensión del fragmento solapado, el porcentaje de semejanza y el nombre del microorganismo con un mayor grado de identidad de secuencia (Tabla 2).

Posteriormente se realizó un análisis filogenético utilizando el programa ARB y la base de datos curada de SILVA (LTPs108_SSU.arb). Para el análisis se emplearon 32 especies, 3
25 de las cuales se han usado como outgroup para enraizar el árbol. Con los datos obtenidos se elaboró un árbol filogenético mediante los parámetros de Neighbour Joining (corrección Jukes Cantor). El árbol que se presenta en la Figura 2 sólo muestra las cepas tipo de las especies más relacionadas con la bacteria aislada en el Ejemplo 1 (CEBAS 1/15P). Como resultado, se concluyó que la bacteria aislada en el ejemplo 1 (CEBAS 1/15P) pertenece a la
30 familia Coriobacteriaceae (Figura 2). Aunque *Gordonibacter pamelaee* (cepa tipo DSM 19378) es la cepa conocida más cercana filogenéticamente, su semejanza con la cepa *Gordonibacter* sp. (CEBAS 1/15P DMS 26536) es baja (97% sobre la secuencia AM886059). Por lo tanto, la bacteria del ejemplo 1 se considera perteneciente a una nueva especie dentro del género *Gordonibacter* donde la única cepa y especie conocida es *Gordonibacter*
35 *pamelaee* (cepa tipo DSM 19378). En la Tabla 2 se muestra el porcentaje de similitud de

cada cepa tipo frente a la secuencia *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P DMS 26536 calculado con el programa ARB.

Las propiedades bioquímicas de la bacteria del Ejemplo 1 (*Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P DMS 26536), y las 4 especies más cercanas filogenéticamente, *G. pamelaeeae* DSM 19378, *Paraeggerthella hongkongensis* HKU10; *Eggerthella lenta* ATCC 25559; *Eggerthella sinensis* HKU14, se analizaron por medio del sistema Rapid ID 32A, 20A (SYSMEX bioMerieux Co., Ltd.) y GEN III (Biolog). Estos sistemas permiten caracterizar la capacidad de crecimiento de microorganismos utilizando diferentes fuentes de carbono en su metabolismo, sus capacidades enzimáticas y su capacidad de crecer en ciertas condiciones de pH, NaCl, así como en presencia de algunos compuestos ej. antibióticos. Cada bacteria ensayada se cultivó en placa de agar a 37°C durante 72 horas bajo condiciones anaeróbicas. La determinación de API 20A, ID32A, y GEN III se realizó siguiendo el protocolo de la casa comercial. La Tabla 3 muestra los resultados.

En el análisis por medio de API 20A, ID32A, y GEN III, la bacteria aislada en el ejemplo 1 exhibió ciertas propiedades que la diferencian de las especies más próximas filogenéticamente (*G. pamelaeeae* DSM 19378, *P. hongkongensis* HKU10, *E. lenta* ATCC 25559 y *E. sinensis* HKU14). Particularmente, *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P es capaz de metabolizar ciertas fuentes de carbono como L-fucosa, D-turanosa, D-fructosa, ácido D-galacturónico, y ácido α -ketobutírico mientras que *G. pamelaeeae* DSM 19378 carece de esa capacidad. Por otro lado, *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P y *G. pamelaeeae* DSM 19378 fueron capaces de metabolizar la dextrina mientras que *Paraeggerthella hongkongensis* HKU10; *Eggerthella lenta* ATCC 25559; *Eggerthella sinensis* HKU14 no.

Por lo tanto, los estudios genéticos y bioquímicos han revelado que la bacteria aislada en el ejemplo 1 es una nueva especie que pertenece al género *Gordonibacter*, y ha sido denominada por los inventores cepa *Gordonibacter urolithinfaciens* CEBAS 1/15P DSM 26536.

También se estudió la actividad de producción de urolitinas de otras cepas bacterianas pertenecientes a especies cercanas filogenéticamente a la bacteria de la presente invención CEBAS 1/15P DSM26536. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. *G. pamelaeeae* DSM 19378 también fue capaz de transformar el ácido elágico en urolitinas por lo que esta capacidad de dicha cepa bacteriana también forma parte de la presente invención. En contraste, otras bacterias pertenecientes a especies bacterianas

filogenéticamente cercanas, como *Paraeggerthella hongkongensis* HKU10; *Eggerthella lenta* ATCC 25559; *Eggerthella sinensis* HKU14 no fueron capaces de producir urolitinas a partir de ácido elágico. Por tanto, los estudios realizados han puesto de manifiesto la capacidad de *G. pamelaee* DSM 19378 de producir urolitinas que no había sido demostrada previamente.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la secuenciación del gen ARNr 16S de *Gordonibacter* CEBAS 1/15P.

Gen	Cebadores	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Identificación de la secuencia en la patente
ARN 16S	616 V	AGAGTTTGATYMTGGCTCA	SEQ ID NO: 12
	699 R	AGGGTTGCGCTCGTTGC	SEQ ID NO: 13
	P609 D	GGMTTAGATACCCBDGTA	SEQ ID NO: 14
	P1525 R	WAGGAGGTRATCCADCC	SEQ ID NO: 15

Tabla 2. Cálculo de los valores de semejanza entre las secuencias *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P y las de las especies más cercanas filogenéticamente.

Especie, cepa, (nº acceso secuencia)	% de semejanza	id/total nt
<i>Gordonibacter</i> sp. CEBAS 1/15P	100	1458/1458
<i>Gordonibacter pamelaee</i> 7-10-1-b (AM886059)	97,1	1411/1453
<i>Paraeggerthella hongkongensis</i> HKU10 (AY288517)	94,3	1346/1427
<i>Eggerthella sinensis</i> HKU14 (AY321958)	94,3	1348/1429
<i>Eggerthella lenta</i> ATCC 25559 (AF292375)	93,0	1374/1476
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i> FJC-B9 (AB306661)	92,6	1347/1455
<i>Asaccharobacter celatus</i> do03 (AB266102)	92,4	1304/1411
<i>Enterorhabdus caecimuris</i> B7 (DQ789120)	92,2	1342/1455
<i>Slackia heliotrinireducens</i> ATCC 29202 (AF101241)	91,9	1340/1458
<i>Denitrobacterium detoxificans</i> NPOH1 (U43492)	91,8	1295/1410

<i>Slackia exigua</i> ATC 700122 (AF101240)	91,7	1340/1460
<i>Enterorhabdus mucosicola</i> Mt1B8 (AM747811)	91,6	1223/1335

Tabla 3. Comparación de las propiedades bioquímicas de (1) *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P; (2) *G. pamelaeeae* DSM 19378; (3) *Paraeggerthella hongkongensis* HKU10; (4) *Eggerthella lenta* ATCC 25559; (5) *Eggerthella sinensis* HKU14 analizadas mediante el método API ID32A, 20A y GEN III. +, Positivo; -, negativo; V, variable; NA, dato no disponible.

Características	1	2	3	4	5
Producción de urolitinas	+	+	-	-	-
Dextrina	+	+	-	-	-
L-Fucosa	+	-	-	-	+
D-Fructosa	+	-	NA	NA	NA
D-Turanosa	+	-	NA	NA	NA
Acido D-Galacturonic	+	-	NA	NA	NA
D-Mannosa	-	-	-	+	-
Rafinosa	-	-	-	+	-
L-Rhamnosa	-	-	+	-	-
Trehalose	-	-	-	+	-
Acido α -Ketobutyrico	+	-	-	-	+
β -Galactosidasa-6-fosfato	-	-	-	-	-
β -Galactosidasa	-	-	-	-	-
β -Glucosidasa	-	-	+	-	-
α -Arabinosidasa	-	-	-	-	-
α -Fucosidasa	-	-	-	V	-
Arginina arilamidasa	-	-	-	V	+
Prolina arilamidasa	-	-	-	V	-
Fenilalanina arilamidasa	-	-	-	V	-
Leucina arilamidasa	-	-	-	V	-
Tirosina arilamidasa	-	-	-	V	-
Alanina arilamidasa	-	-	-	V	-
Glicina arilamidasa	-	-	-	V	-
Histidina arilamidasa	-	-	-	V	-

EJEMPLO 3: Análisis de la ruta de biotransformación de ácido elágico en urolitinas mediante *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P y *Gordonibacter pamelaeeae* DMS 19378

La capacidad de *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P y *Gordonibacter pamelaeeae* DMS 19378 para convertir el ácido elágico en urolitinas se analizó tal como se describe a continuación. A un medio líquido (1.6% peptona, 0.7% extracto de levadura, 0.5% NaCl, 0.1% almidón, 0.1% Dextrosa, 0.1% piruvato sódico, 1% arginina, 0.05% succinato de sodio, 0.05% hidrocloreuro de L-cisteína, 0.04% bicarbonato sódico, 0.5% pirofosfato férrico, 0.0005% hemina, 0.00005 % vitamina K, 0.05% tioglicolato de sodio, 0.1% ditioneitol) se añadió ácido elágico a una concentración final de 9 µM, y la bacteria *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P o *Gordonibacter pamelaeeae* DMS 19378 a una concentración final de 70 y 10⁷ células/mL de medio. Las suspensiones se incubaron a 37 °C bajo una mezcla de gas (N₂: H₂: CO₂ = 80:10:10) durante 172 horas. Durante el curso del cultivo, se tomaron alícuotas periódicamente para determinar el tipo y concentración de urolitinas de la solución de cultivo mediante HPLC y de este modo, analizar la ruta de biotransformación el ácido elágico en distintas urolitinas. A estas alícuotas del cultivo se les añadió un equivolumen de acetato de etilo (5 mL). La mezcla se agitó en un vortex y se centrifugó (3.500 x g durante 10 minutos) para separar así la mezcla en dos capas. Se recuperó la capa superior de acetato de etilo que se llevó a sequedad a 35 °C en un concentrador a vacío. Finalmente se reconstituyó en 250 µL de metanol y se filtró utilizando filtros de PVDF de 0.45 µm. La ruta metabólica de producción de urolitinas se muestra en la Figura 3. La cuantificación de los resultados obtenidos mediante HPLC muestran que *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P DSM (70 células /mL de medio) fue capaz de convertir el 100 % del ácido elágico disuelto a urolitinas en la incubación durante 162 horas coincidiendo con fase estacionaria de la curva de crecimiento de la bacteria (Figura 4). Cuando se utilizaron concentraciones celulares de *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P mayores (10⁷ células /mL de medio) el porcentaje de conversión fue del 24% a las 72 h y del 100 % a las 175 horas. Las principales urolitinas sintetizadas por las bacterias *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P y *Gordonibacter pamelaeeae* DMS 19378 fueron penta-hidroxi urolitina, tetra-hidroxi urolitina y urolitina C y su cinética de producción se muestra en la Figura 5.

EJEMPLO 4. Diseño de un fragmento de ácido nucléico específico para especies microbianas productoras de urolitinas.

Las secuencias de nucleótidos del gen ARNr 16S de bacterias pertenecientes a la familia Coriobacteriaceae se obtuvieron a partir de una base de datos pública (EMBL) y las secuencias así obtenidas de cepas estrechamente relacionadas (*Paraeggerthella hongkongensis* HKU10; *Eggerthella lenta* ATCC 25559; *Eggerthella sinensis* HKU14), se alinearon con las secuencias de nucleótidos de ARNr 16S de las dos cepas productoras de urolitinas, *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P (SEQ ID NO: 1) y *G. pamelaeeae* DSM 19378 por

medio del programa Mega4. Se diseñaron dos cebadores directos (Uro-F y Uro2-F) y dos cebadores reversos (Uro-R y Uro2-R (SEQ ID NO: 3, 4, 5 y 6) y una sonda TaqMan (Uro Probe; SEQ ID NO: 7) frente a la región específica de estas dos bacterias productoras de urolitinas (SEQ ID NO: 2) (Tabla 4).

5

Se hicieron diluciones seriadas del ADN extraído de *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P DSM 26536 (2×10^8 células/mL) con el fin de ajustar la concentración de células desde 2×10^6 a 2×10^1 células/mL. Una alícuota (5 μ L) de la solución diluida de ADN se empleó como ADN molde, y se realizó la PCR a tiempo real cuantitativa utilizando como cebadores los oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 3 y 5, así como la sonda TaqMan identificada como SEQ ID NO: 7. Se realizó la PCR cuantitativa durante 40 ciclos (cada ciclo: 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min). La amplificación por PCR se correlacionó con el número de células en el intervalo de 10^{-3} a 10^3 células poniendo de manifiesto la utilidad de la PCR cuantitativa en la identificación de bacterias capaces de producir urolitinas utilizando como cebadores los oligonucleótidos SEQ ID NO: 3 y 5 y como sonda el oligonucleótido SEQ ID NO: 7.

15

Tabla 4. Cebadores y sonda utilizadas para la identificación y cuantificación de *Gordonibacter* CEBAS 1/15P y *Gordonibacter pamelaee*.

Gen	Cebadores	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Identificación de la secuencia en la patente
ARN 16S	Uro F	GGCTCGAGTTTGGTAGAGGAAGAT	SEQ ID NO: 3
	Uro2 F	CGGGTTCCGAAGTGGCA	SEQ ID NO: 4
	Uro R	GGCCCAGAAGACTGCCTT	SEQ ID NO: 5
	Uro2 R	AGGGTATCTAATCCTGTTGCTCC	SEQ ID NO: 6
	Uro probe	FAM- AATTCCCGGTGTAGCGGTGGAATGC- BBQ	SEQ ID NO: 7

20

EJEMPLO 5. Análisis de muestras fecales de humanos.

Se extrajo el ADN de muestras de heces de 10 voluntarios sanos. Cada muestra de ADN se sometió a PCR cuantitativa mediante el uso de los cebadores definidos por las SEQ ID NO: 3 y 5 y la sonda TaqMan SEQ ID NO: 7. Específicamente, se tomaron muestras de las heces (20 mg) de cada voluntario, e inmediatamente después, se extrajo el ADN total utilizando el kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Madrid, Spain). La

25

concentración y la pureza del ADN se midieron en un espectrofotómetro a 260 nm (Nanodrop Technologies). Los ADN totales obtenidos de este modo se diluyeron apropiadamente, y el producto diluido se sometió a PCR cuantitativa según el método descrito en el Ejemplo 4. El recuento de *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P de la muestra se

EJEMPLO 6. Producción e identificación de urolitinas.

A un medio líquido (1.6% peptona, 0.7% extracto de levadura, 0.5% NaCl, 0.1% almidón, 0.1% Dextrosa, 0.1% piruvato sódico, 1% arginina, 0.05% succinato de sodio, 0.05% hidrocloreto de L-cisteína, 0.04% bicarbonato sódico, 0.5% pirofosfato férrico, 0.0005% hemina, 0.00005 % vitamin K, 0.05% tioglicolato de sodio, 0.1% ditioneitol) que contenía ácido elágico, se le añadió *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P (10^7 células / mL de medio). El medio que contenía las células se incubó durante 175 horas a 37 °C bajo una mezcla de gas (N_2 : H_2 : CO_2 = 80:10:10). A continuación, al medio de cultivo se le añadió un equivolumen de acetato de etilo. La mezcla se agitó y se centrifugó (3.500 x g durante 10 minutos) para separar así la mezcla en dos capas. Se recuperó la capa superior de acetato de etilo que se llevó a sequedad a 35 °C en un concentrador a vacío. Finalmente se reconstituyó en metanol y se filtró utilizando filtros de PVDF de 0.45 µm. Las urolitinas se identificaron en el producto resultante de la filtración tal como se describe en el ejemplo N° 1 de la presente invención.

EJEMPLO 7. Producción de cápsulas, comprimidos o formulaciones equivalentes.

Para la preparación de cápsulas, comprimidos o preparaciones equivalentes se mezcló una cantidad efectiva de células de bacterias de la presente invención, con cantidades apropiadas de celulosa, trealosa, estearato de magnesio, metilcelulosa y extracto de granada en las cantidades indicadas en la Tabla 5. La mezcla se granuló, se secó y refinó, para de ese modo producir los comprimidos. Para la producción de cápsulas se podría prescindir de celulosa en la formulación. Para la preparación de formulaciones equivalentes es imprescindible que la formulación cuente, entre sus ingredientes, con una cantidad efectiva de las bacterias de la presente invención *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P o *Gordonibacter pamelaee* DSM 19378 o ambas, y una fuente de elagitaninos o ácido elágico como extracto de granada entre otros, el resto de componentes de la Tabla 5 pueden ser sustituidos por otros componentes equivalentes o eliminados, siempre que los componentes utilizados no afecten a la producción de urolitinas o al metabolismo del ácido elágico y elagitaninos.

TABLA 5. Ejemplo de formulación de capsulas o comprimidos.

Formulación	(mg)
Bacterias de la presente	10
Celulosa	100
Trealosa	15
Estearato de magnesio	0.5
Metil-celulosa	12
Extracto de granada: contenido en punicalagina y ácido elágico	200

¹⁾ Células viables liofilizadas de *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P (10^{10} células viables / g).

EJEMPLO 8. Producción de una bebida no alcohólica.

5 Para la formulación de una composición alimenticia o bebida no alcohólica, los ingredientes que se muestran en la Tabla 6 se mezclaron mediante un método rutinario. La mezcla se homogeneizó, se incubó a 37 °C bajo una mezcla de gas (N₂: H₂: CO₂ = 80:10:10) a fin de obtener una bebida no alcohólica rica en urolitinas. La bebida se envasó en una botella fotoprotectora marrón, y la botella se cerró herméticamente con un tapón de aluminio, y a

10 continuación se llevó a cabo un tratamiento térmico para inactivar las bacterias. También es posible formular bebidas no alcohólicas que incluyan en su composición una cantidad efectiva de las bacterias de la presente invención *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P o *Gordonibacter pamelaeeae* DSM 19378 que se añadan a zumo y néctar de frutas, mermelada, leche, refrescos, bebidas a base de té o sus combinaciones.

15 Para la formulación de una composición alimenticia es posible modificar el saborizante indicado en la Tabla 6 y sustituir el zumo de granada como fuente de elagitaninos, por otra fuente de éstos como fresas, frambuesas, castañas, moras, nueces, extractos de plantas medicinales ricos en ácido elágico o elagitaninos, o material vegetal como hoja de roble o bellotas. Se puede formular cualquier composición alimenticia que contenga una cantidad

20 efectiva de las bacterias de la presente invención *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P o *Gordonibacter pamelaeeae* DSM 19378 junto con componentes alimenticios y vehiculares que no inhiban la actividad de las enzimas productoras de urolitinas a partir de ácido elágico y/o elagitaninos.

25 La preparación de composiciones alimenticias también es posible añadiendo una cantidad efectiva de las bacterias de la presente invención *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P o *Gordonibacter pamelaeeae* DSM 19378, a una variedad de alimentos, por ejemplo, productos cárnicos procesados (por ejemplo, jamón y salchichas), los productos de pescado (por

ejemplo, kamaboko y chikuwa), pan, productos de confitería, mantequilla, leche en polvo y leche fermentada. Tal como se utiliza aquí, el término "alimento o bebida" abarca alimentos también para animales.

5

TABLA 6. Ejemplo de formulación de una bebida no alcohólica.

Formulación	(g)
Bacterias de la presente invención ¹	0.5
Saborizante natural: extracto de vainilla	3
Zumo de granada	96.5

¹) Células viables liofilizadas de *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P (10^{10} células viables / g).

REIVINDICACIONES

1. Microorganismos capaces de producir urolitinas caracterizados porque:
 - (i) Se seleccionan a partir de muestras biológicas de individuos productores de urolitinas,
 - (ii) Son capaces de crecer en un medio de cultivo apropiado que contiene ácido elágico y/o elagitaninos ,
 - (iii) Son capaces de producir urolitinas cuando se incuban en medio de cultivo (ii), durante un periodo de tiempo determinado y suficiente, en condiciones de atmósfera y temperatura adecuadas,
 - (iv) Las urolitinas producidas pueden determinarse mediante técnicas adecuadas, y porque pertenecen a especies bacterianas del género *Gordonibacter* seleccionadas entre *Gordonibacter* sp. CEBAS 1/15P (DSM 26536) o *Gordonibacter pamelaee* (DSM 19378).
2. Microorganismos capaces de producir urolitinas según la reivindicación anterior caracterizados porque dicha selección (i) se realiza a partir de muestras biológicas de individuos (humanos o animales) productores de urolitinas tales como heces, contenidos del tracto digestivo como colon descendente, ciego u otros.
3. Microorganismos productores de urolitinas según reivindicación anterior caracterizados porque dicha selección (i) se realiza a partir de muestras procedentes de individuos productores de urolitinas que se someten a un cribado mediante subcultivo en medio de crecimiento líquido.
4. Microorganismos productores de urolitinas según reivindicación 1 caracterizado porque dicha (ii) capacidad de crecer en medio que contiene ácido elágico y/o elagitaninos se establece preferentemente mediante cultivo en medio líquido suplementado con ácido elágico y/o elagitaninos en una concentración final de entre 3 y 30 μ M.
5. Microorganismos productores de urolitinas según reivindicación anterior caracterizado porque dicha (ii) capacidad de crecer en medio que contiene ácido elágico y/o elagitaninos se realiza en un medio que contiene componentes adecuados, como sacáridos y fuente de nitrógeno y que no contenga componentes que inhiban la capacidad de producción de urolitinas o la proliferación de los microorganismos de la presente invención. Entre los componentes del medio de cultivo se pueden encontrar componentes tales como peptona, peptona tripticasa, extracto de levadura, hemina, histidina, vitaminas, como la

vitaminas K, L-cisteína, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 , MgSO_4 , glúcidos y fibras. Alternativamente podrían sustituirse los componentes del medio excepto el ácido elágico y/o elagitaninos y la arginina utilizando el medio Wilkins-chalgren, medio basal para anaerobios, el medio BHI, el medio DRCM, u otros.

5

6. Microorganismos productores de urolitinas según reivindicación 1 caracterizados porque dicha (iii) capacidad de producir urolitinas cuando se incuban en medio de cultivo (ii), durante un periodo de tiempo determinado y suficiente, en condiciones de atmósfera y temperatura adecuadas, tiene lugar preferentemente durante un tiempo de entre 20 y 300
10 horas, a una temperatura de entre 28 y 40 °C y en una atmosfera que contenga concentraciones de $\text{N}_2:\text{H}_2:\text{CO}_2$ que garanticen la ausencia de O_2 , o cualquiera de las combinaciones posibles de tiempo, atmósfera y temperatura indicadas.

7. Microorganismos productores de urolitinas según reivindicación anterior
15 caracterizados porque dicha (iii) capacidad de producir urolitinas cuando se incuban en medio de cultivo (ii), durante un periodo de tiempo determinado y suficiente, en condiciones de atmósfera y temperatura adecuadas, tiene lugar preferentemente a una temperatura de 37 °C, en una atmosfera de $\text{N}_2:\text{H}_2:\text{CO}_2 = 80:10:10$, y durante un periodo de entre 40 y 175 horas.

20

8. Microorganismos productores de urolitinas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que dichas especies bacterianas son capaces de crecer en medios de crecimiento líquidos o sólidos y metabolizar compuestos fenólicos de la dieta.

25 9. Procedimiento de producción de urolitinas basado en la utilización de los microorganismos productores de urolitinas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

- (i) Inoculación del microorganismo productor de urolitinas en medio líquido suplementado con ácido elágico y/o elagitaninos para generar el cultivo
- 30 (ii) Incubación del cultivo durante un periodo de tiempo adecuado y suficiente, en condiciones de atmósfera y temperatura adecuadas
- (iii) Extracción y purificación de las urolitinas producidas.

10. Procedimiento de producción de urolitinas según reivindicación anterior caracterizado
35 porque dicha inoculación del microorganismos en medio líquido (i) se realiza

preferentemente en un medio según reivindicación 5 suplementado con ácido elágico y/o elagitaninos según reivindicación 4.

11. Procedimiento de producción de urolitinas según reivindicación 9 caracterizado porque dicha Incubación (ii) del cultivo durante un periodo de tiempo adecuado y suficiente, en condiciones de atmósfera y temperatura adecuadas, se realiza preferentemente según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7.

12. Procedimiento de producción de urolitinas según reivindicación 9 en la que la dicha extracción y purificación (iii) de las urolitinas producidas en el medio de cultivo se realiza mediante un proceso de extracción con plasma o un proceso de purificación convencional tales como cromatografía en columna o la extracción con disolvente orgánico u otros procedimientos de extracción y purificación conocidos y aplicables.

13. Procedimiento para el aislamiento de microorganismos productores de urolitinas a partir de muestras biológicas caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

- (i) Recogida de colonias de bacterias crecidas en medio de cultivo sólido
- (ii) Subcultivo de las colonias aisladas en medio de cultivo líquido suplementado con ácido elágico o elagitaninos
- (iii) Incubación de los medios inoculados a temperatura y tiempo adecuados, en condiciones de atmosfera adecuada
- (iv) Extracción del medio de cultivo con un disolvente orgánico
- (v) Adsorción en columna de intercambio iónico y elución con metanol
- (vi) Análisis de las urolitinas producidas mediante HPLC u otros medios de análisis como RMN u otros.

14. Polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad de al menos un 90 % frente a la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 1 ó 2 ó 3 ó 4 ó 5 ó 6 ó 7 ó 8 ó 9 ó 10 ó 11 o a su complementaria.

15. Polinucleótido según reivindicación anterior cuya secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad de al menos un 95 % frente a la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 1 ó 2 ó 3 ó 4 ó 5 ó 6 ó 7 ó 8 ó 9 ó 10 ó 11 o a su complementaria.

16. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 14 y 15 cuya secuencia de nucleótidos es la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 1 ó 2 ó 3 ó 4 ó 5 ó 6 ó 7 ó 8 ó 9 ó 10 ó 11 o su complementaria.

17. Procedimiento de aislamiento e identificación de microorganismos productores de urolitinas caracterizado por la utilización de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 para dicho aislamiento e identificación mediante hibridación por técnicas tales como la hibridación in situ, la hibridación dot blot, la hibridación southern blot u otros métodos de hibridación con el material genético de las bacterias de una muestra biológica.

18. Procedimiento de aislamiento e identificación de microorganismos productores de urolitinas, según reivindicación anterior, caracterizado por la utilización del polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, mediante hibridación in situ se realiza preferentemente mediante métodos tales como el método FISH, empleando dicho polinucleótido marcado con un tinte fluorescente u otros marcadores.

19. Procedimiento de identificación y cuantificación de microorganismos productores de urolitinas, a través del conteo de las células marcadas caracterizado por la utilización del polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, mediante hibridación in situ que se realiza mediante métodos tales como el método FISH, empleando dicho polinucleótido marcado con un tinte fluorescente u otros marcadores.

20. Procedimiento para el aislamiento, identificación y cuantificación de microorganismos productores de urolitinas caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

- (i) Extracción de ácidos nucleicos totales de los microorganismos candidatos (ADN o ARN)
- (ii) Amplificación mediante PCR convencional o a tiempo real
- (iii) Correlación de los resultados de la amplificación con la amplificación del microorganismo productor de urolitinas.

21. Procedimiento para el aislamiento, identificación y cuantificación de microorganismos productores de urolitinas según reivindicación anterior caracterizado porque en dicha amplificación (ii) mediante PCR a tiempo real cuantitativa se correlacionan los resultados de la amplificación con el número de células del microorganismo productor de urolitinas.

22. Procedimiento para el aislamiento, identificación y cuantificación de microorganismos productores de urolitinas según reivindicación 20 caracterizado porque dicha amplificación (i) mediante PCR se hace utilizando como cebadores dos oligonucleótidos seleccionados entre los oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 3 ó 4, ó 5, ó 6 o sus complementarios u oligonucleótidos que presentan un grado de identidad de secuencia superior al 90 % con dichas secuencias o cualquiera de sus combinaciones.
23. Procedimiento para el aislamiento, identificación y cuantificación de microorganismos productores de urolitinas según reivindicación 20 caracterizado porque dicha amplificación (ii) mediante PCR a tiempo real cuantitativa se hace utilizando como sonda TaqMan un polinucleótido cuya secuencia es la secuencia identificada como SEQ ID. NO: 7 o su complementaria o un polinucleótido que presenta un grado de identidad de secuencia superior al 90 % con dicha secuencia.
24. Método de identificación de individuos que contienen microorganismos capaces de producir urolitinas, caracterizado porque se obtienen muestras de heces o contenidos del tracto digestivo como colon descendente, ciego u otros en cantidad adecuada y se somete al procedimiento para el aislamiento e identificación de microorganismos productores de urolitinas según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 18, o a un procedimiento de identificación y cuantificación según reivindicación 19, o se extrae ADN total de dichas muestras, mediante métodos convencionales y una dilución apropiada de dicho ADN se somete al procedimiento de aislamiento, identificación y cuantificación según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23.
25. Sistema de producción de urolitinas caracterizado porque se utilizan los microorganismos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o los microorganismos aislados por el procedimiento descrito según reivindicación 13, o los microorganismos aislados e identificados por los procedimientos descritos según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, o los microorganismos aislados identificados y cuantificados cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23.
26. Sistema de producción de urolitinas según reivindicación anterior caracterizado porque las urolitinas se producen preferentemente por el sistema descrito según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 o por un sistema de producción in vitro basado en el uso cualquiera de las células viables o células térmicamente desnaturalizados (células muertas) de dichos microorganismos o sus enzimas, o productos de dichos microorganismos tales

como un producto liofilizado, un producto de cultivo (por ejemplo, sobrenadante de cultivo), un producto de células tratadas, u otro producto donde el microorganismo se emplea preferiblemente en un estado en que se inhiba la inactivación de sus enzimas.

5 27. Urolitinas producidas según cualquiera de las reivindicaciones 25 o 26.

28. Composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas, probióticas y/o alimentos funcionales que contienen urolitinas según reivindicación anterior.

10

29. Composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas, probióticas y/o alimentos funcionales con un microorganismo productor de urolitinas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o un microorganismo aislado por el procedimiento descrito según la reivindicación 13, o los microorganismos aislados e
15 identificados por los procedimientos descritos según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, o según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23.

20

30. Composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas, probióticas y/o alimentos funcionales según reivindicación anterior
caracterizados por que contienen células viables o células térmicamente desnaturalizadas de dicho microorganismo, o un producto liofilizado del mismo, o un producto de cultivo (por ejemplo, sobrenadante de cultivo que contenga urolitinas sin contener el microorganismo), u otros, siempre y cuando las células o productos derivados de los microorganismos se empleen en un estado en el que se inhiba la inactivación de sus enzimas.

25

31. Composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas, probióticas y/o alimentos funcionales según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 30 caracterizados por que además de dicho microorganismo o sus productos contienen ácido elágico.

30

32. Composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas, probióticas y/o alimentos funcionales según reivindicación anterior caracterizados por que contienen además, o en vez de ácido elágico, elagitaninos tales como por ejemplo la punicalagina de la granada, los elagitaninos de las nueces, las fresas,
35 las frambuesas, plantas medicinales, así como tejidos vegetales ricos en elagitaninos (hoja de roble, bellotas etc), entre otros.

33. Composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas, probióticas y/o alimentos funcionales según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32 caracterizados por que además de dicho microorganismo o sus productos contienen metabolitos intermedios de conversión del ácido elágico a urolitina A, por ejemplo, urolitina M5, urolitina D, u otras.

34. Composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas, probióticas y/o alimentos funcionales según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 33 caracterizados por que además de dicho microorganismo o sus productos, contienen un producto natural que contenga una gran cantidad de elagitaninos o uno de sus productos procesados. Dichos productos pueden ser preferentemente productos tales como granada, nueces, fresas, castañas, moras, frambuesas, u otros. Dichos productos procesados pueden incluir preferentemente productos tales como el zumo de granada, el zumo de fresa u otros zumos o derivados de cualquier producto rico en elagitaninos.

35. Composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones probióticas y/o alimentos funcionales según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 34 que se administra por vía oral sin modificar o mezclada con aditivos y/o componentes nutricionales por medios convencionales que pueden añadirse a un alimento o bebida, de forma adecuada para poder comerse o beberse.

36. Composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones probióticas y/o alimentos funcionales según reivindicación anterior caracterizada por que se presenta en forma de gránulos, partículas, comprimidos, cápsulas, pasta u otros, que se añaden entre otros a alimentos tales como productos cárnicos procesados (tales como por ejemplo, jamón y salchichas) u otros, a productos de pescado (tales como por ejemplo, kamaboko y chikuwa) u otros, a pan, productos de confitería, mantequilla, leche en polvo y leche fermentada, o se añaden a bebidas tales como agua, zumo y néctar de frutas, mermelada, leche, refrescos, bebidas a base de té o sus combinaciones, u otros.

37. Composiciones farmacéuticas según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 34 que se administran por vía oral, rectal o parenteral mediante mezcla de dichas composiciones con un portador farmacéutico no tóxico sólido o líquido, seleccionado dependiendo del método de administración (por ejemplo, administración oral, administración rectal, o por inyección), para producir con ello una preparación farmacéutica común.

38. Composiciones farmacéuticas según reivindicación anterior que pueden presentarse en preparaciones sólidas tales como tabletas, gránulos, polvo, y cápsulas, preparaciones líquidas tales como soluciones, suspensiones, y emulsiones, jarabes y preparaciones liofilizadas, producidas a través de un método de fabricación común. Que contienen un
5 vehículo farmacéutico no tóxico tales como cualquier seleccionado de entre almidón, dextrina, glicérido de ácido graso, polietilenglicol, almidón de hidroxietilo, etilenglicol, aminoácido, agua, gelatina, albúmina, solución salina fisiológica u otros. En caso necesario, las composiciones pueden contener aditivos comunes tales como un estabilizador, un agente humectante, un emulsionante, un aglutinante, un agente de tonicidad, y/o un
10 excipiente, entre otros.

39. Composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones probióticas y/o alimentos funcionales según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 36, o composiciones farmacéuticas según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 38, para la
15 alimentación y/o tratamiento de individuos humanos y/o animales.

40. Utilización de las composiciones alimenticias, bebidas, complementos dietéticos, composiciones farmacéuticas, probióticas y/o alimentos funcionales según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 39 para elevar el nivel de urolitinas in vivo, en el organismo, la sangre,
20 el intestino (por ejemplo, el intestino grueso), preferentemente para el tratamiento, mejora, prevención, etc de una variedad de enfermedades y trastornos tales como entre otros la arteriosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares, cáncer de mama, cáncer de próstata, enfermedades inflamatorias intestinales y síndrome premenstrual u otros.

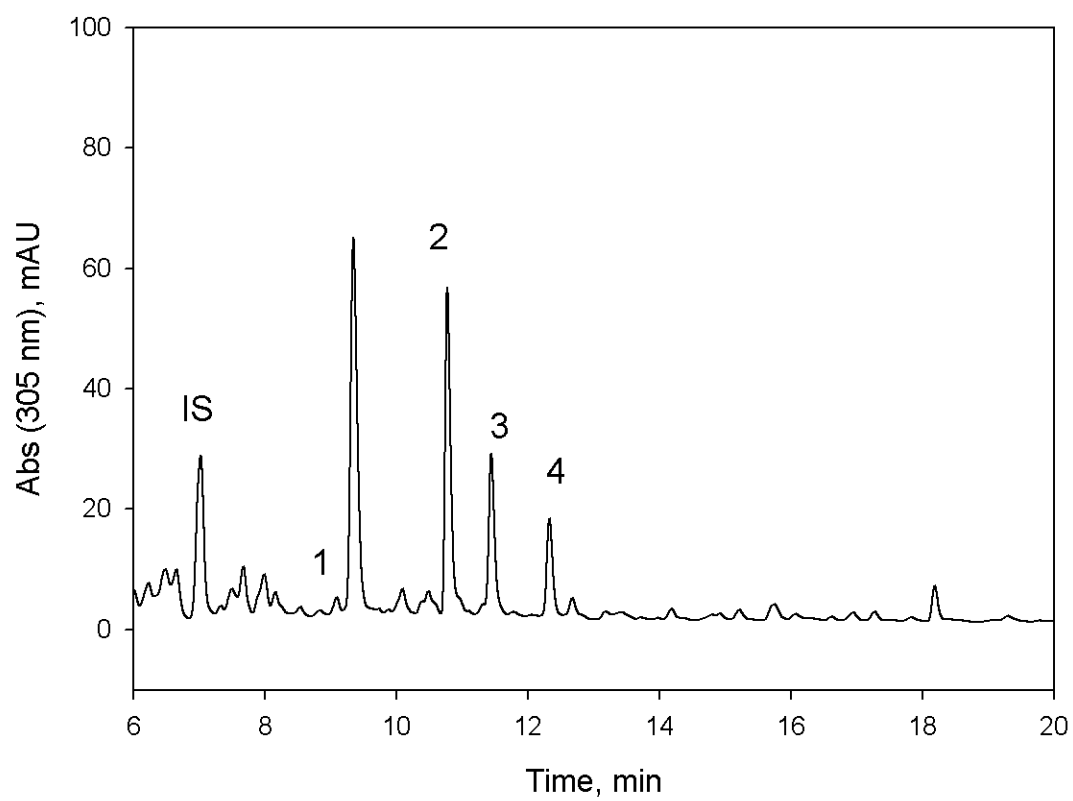


Fig. 1

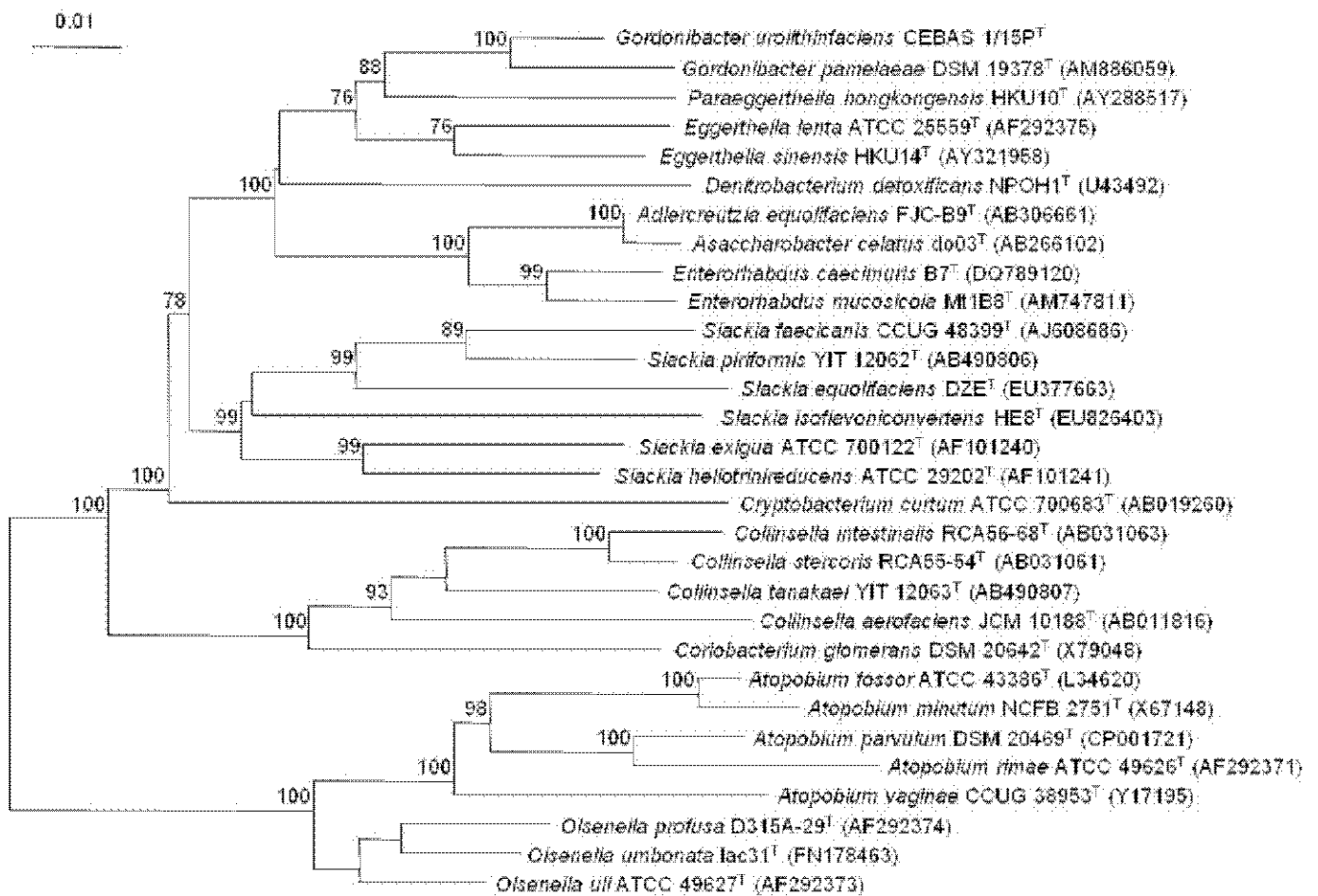


Fig. 2

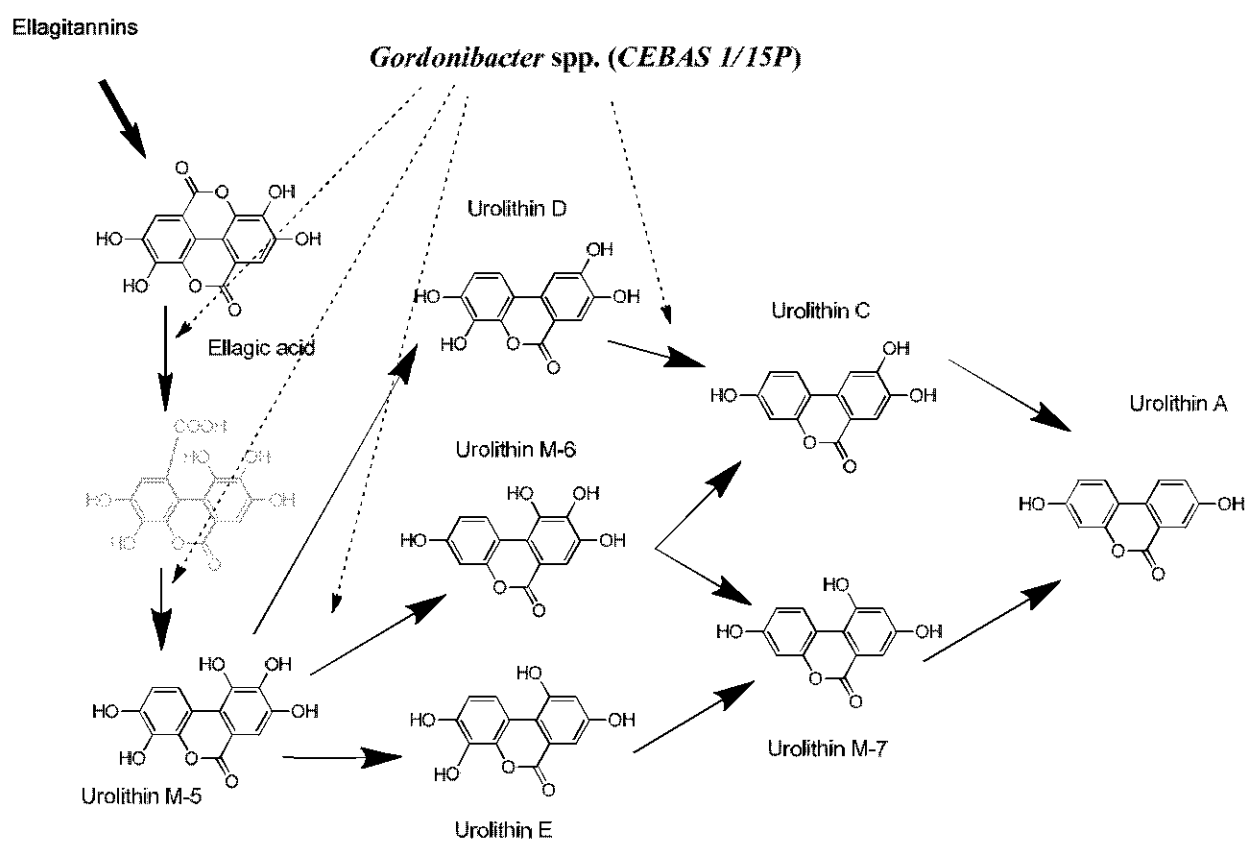


Fig. 3

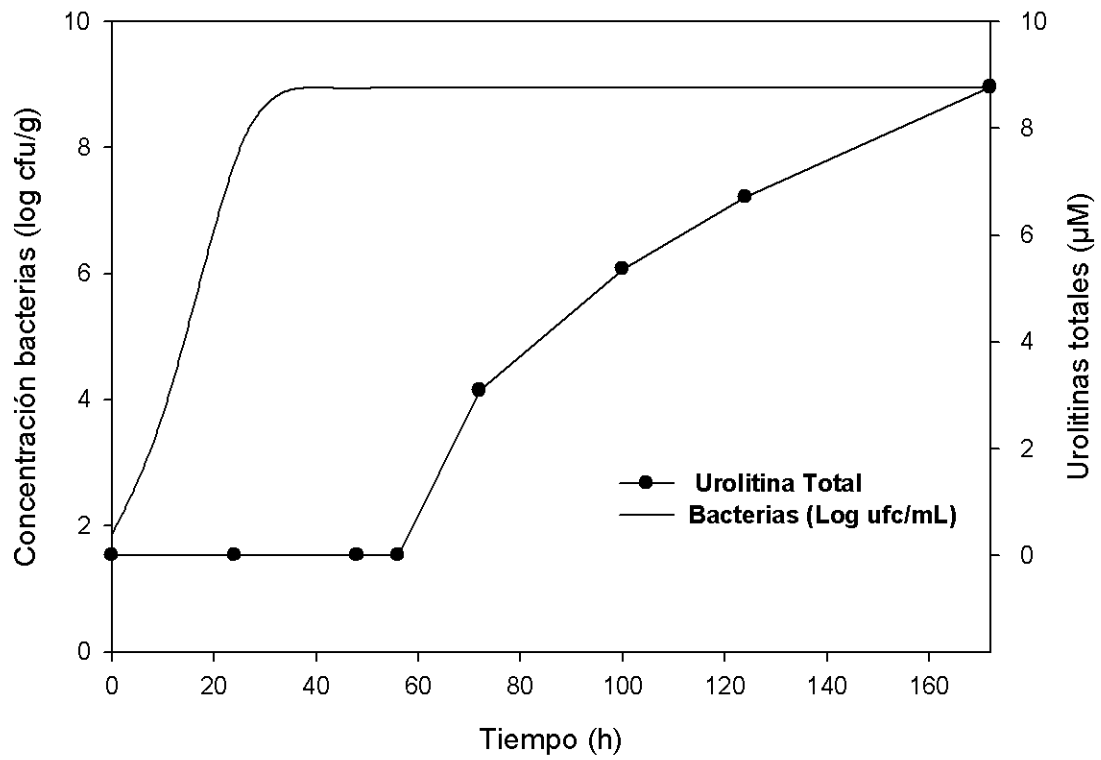


Fig. 4

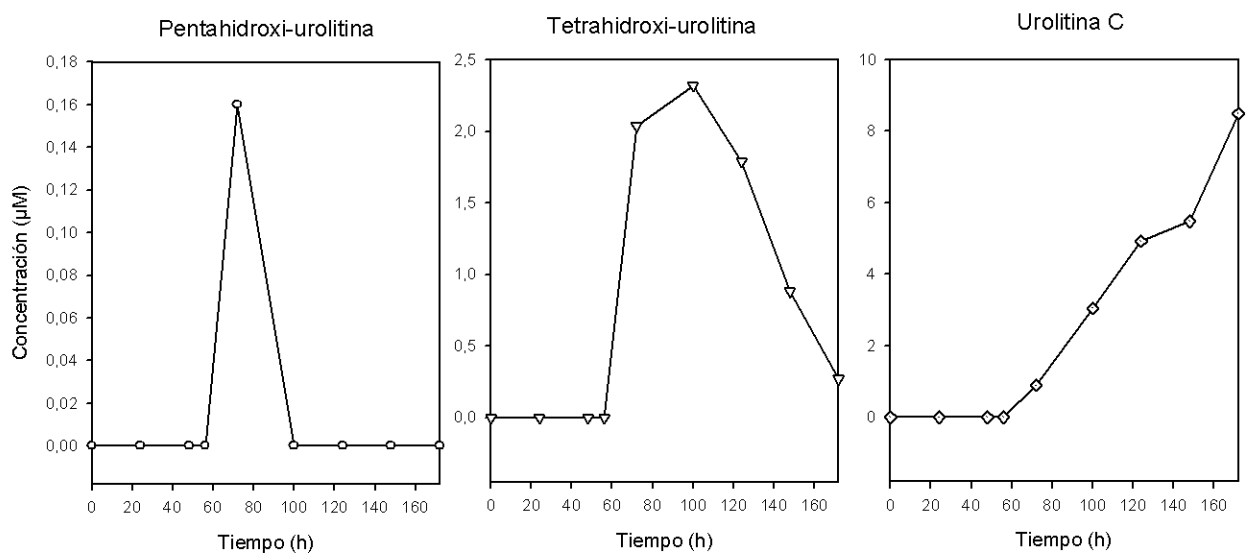


Fig. 5

ES 2 510 216 A1

Lista de Secuencias

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

<120> Microorganismo capaz de convertir ácido elágico y elagitaninos en urolitinas y uso del mismo

<130> 2013-0165

<160> 15

<170> BISSAP 1.2

<210> 1

<211> 1477

<212> DNA

<213> Gordonibacter

<220>

<221> source

<222> 1..1477

<223> /organism="Gordonibacter"
/mol_type="unassigned DNA"

<400> 1

tgctcaggat gaacgctggc ggcgtgccta acacatgcaa gtcgaacgat taaggcgcct	60
tcgggcgcgga atagagtggc gaacgggtga gtaacacgtg accaacctgc cccctcccc	120
gggataacgc gaggaaccc gcgctaatac cggatactcc gcccctcccg catgggaggg	180
gcgggaaaagc cccgacggag ggggatgggg tcgcgggcca ttaggtagac ggcggggcaa	240
cggccccaccg tgcctgcgat gggtagccgg gttgagagac cgaccggcca cattgggact	300
gagatacggc ccagactcct acgggaggca gcagtgggga attttgcgca atggggggaa	360
ccctgacgca gcaacgccgc gtgcgggacg aaggccttcg ggttgtaaac cgctttcagc	420
agggagaag ttgacggtac ctgcagaaga agccccggct aactacgtgc cagcagccgc	480
ggtaatacgt agggggcgag cgttatccgg attcattggg cgtaaagcgc gcgtaggcgg	540
cccgtaagc ggaacctcta acccgagggc tcaacccccg gccgggttc gaactggcag	600
gctcgagtct ggtagaggaa gatggaattc ccggtgtagc ggtggaatgc gcagatatcg	660
ggaagaacac cgatggcgaa ggcagtcttc tgggcccga ctgacgctga ggcgcgaaag	720
ctgggggagc gaacaggatt agataccctg gtagtcccag ccgtaaacga tgggcgctag	780
gtgtgggggg atcatccctc cgtgccgcag ccaacgcatt aagcgccccg cctggggagt	840
acggccgcaa ggctaaaact caaaggaatt gacggggggc cgcacaagca gcggagcatg	900
tggcttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccagggtg tgacatgctg gtgaagccgg	960
ggaaacccgg tggccgagag gagccagcgc aggtggtgca tggctgtcgt cagctcgtgt	1020
cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacccc tgccatatgt tgccagcatt	1080
cagttgggga ctcatatggg actgccggcg tcaagccgga ggaagggtgg gacgacgtca	1140
agtcacatg ccctttatgc cctgggctgc acacgtgcta caatggccgg tacaacgggc	1200
cgcgacctgg cgacaggaag cgaatccctc aaagccggcc ccagttcgga tcggaggctg	1260
caacccgcct ccgtgaagtc ggagttgcta gtaatcgcg atcagcatgc cgcggtgaat	1320
acgttccccg gccttgtaga caccgcccgt cacaccacc gagtcgtctg caccgaagc	1380

ES 2 510 216 A1

cgccggccga acccgcaagg ggcggaggcg tcgaaggtgt ggagggtgaag 1440
tcgtaacaag gtagccgtac cggaaggtgc ggctgga 1477

<210> 2
<211> 689
<212> DNA
<213> Gordonibacter

<220>
<221> source
<222> 1..689
<223> /organism="Gordonibacter"
/mol_type="unassigned DNA"

<400> 2
gccccctcc ccgggataac gcgaggaaac ccgcgctaata accggataact ccgccccctcc 60
cgcatgggag gggcgggaaa gccccgacgg aggggggatgg ggtcgcggcc cattaggtag 120
acggcggggc aacggcccac cgtgcctgcy atgggtagcc gggttgagag accgaccggc 180
cacattggga ctgagatacy gccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaattttgcy 240
caatgggggg aaccttgacy cagcaacgcc gcytgcgggga cgaaggcctt cgggttgtaa 300
accgctttca gcagggaaga agttgacggt acctgcagaa gaagccccgg ctaactacgt 360
gccagcagcc gcggtatac gtagggggcy agcgttatcc ggattcattg ggcgtaaagc 420
gcgcgtaggc ggcccgtaaa gcggaacctc taacctcgagg gctcaacccc cggccggggtt 480
ccgaactggc aggctcagat ctggtagagg aagatggaat tcccgggtgta gcggtggaat 540
gcgcagatat cgggaagaac accgatggcy aaggcagctt tctgggccgc gactgacgct 600
gaggcgcgaa agctggggga gcgaacagga ttagataccc tggtagtccc agccgtaaac 660
gatgggcgct aggtgtgggg ggatcatcc 689

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Gordonibacter

<220>
<221> source
<222> 1..24
<223> /organism="Gordonibacter"
/mol_type="unassigned DNA"

<400> 3
ggctcgagtt tggtagagga agat 24

<210> 4
<211> 17
<212> DNA
<213> Gordonibacter

<220>
<221> source
<222> 1..17
<223> /organism="Gordonibacter"
/mol_type="unassigned DNA"

<400> 4

cgggttccga actggca 17

<210> 5
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Gordonibacter

<220>
 <221> source
 <222> 1..18
 <223> /organism="Gordonibacter"
 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 5
 ggcccagaag actgcctt 18

<210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Gordonibacter

<220>
 <221> source
 <222> 1..24
 <223> /organism="Gordonibacter"
 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 6
 agggatatcta atcctgttcg ctcc 24

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Gordonibacter

<220>
 <221> source
 <222> 1..25
 <223> /organism="Gordonibacter"
 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 7
 aattcccggt gtagcggtagg aatgc 25

<210> 8
 <211> 97
 <212> DNA
 <213> Gordonibacter

<220>
 <221> source
 <222> 1..97
 <223> /organism="Gordonibacter"
 /note="aplicon obtenido usando la sonda y los cebadores uro F y
 uro R "
 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 8
 ggctcgagtc tggtagagga agatggaatt cccggtgtag cggtggaatg cgcagatatc 60

gggaagaaca ccgatggcga aggcagtcctt ctgggcc 97

<210> 9
 <211> 150
 <212> DNA

ES 2 510 216 A1

```

<213> Gordonibacter

<220>
<221> source
<222> 1..150
<223> /organism="Gordonibacter"
      /note="aplicon obtenido usando la sonda y los cebadores uro F y
      uro2 R "
      /mol_type="unassigned DNA"

<400> 9
ggctcgagtc tggtagagga agatggaatt cccggtgtag cggtggaatg cgcagatatc      60
gggaagaaca ccgatggcga aggcagtctt ctgggccgcg actgacgctg aggcgcgaaa      120
gctggggggag cgaacaggat tagataccct                                         150

<210> 10
<211> 114
<212> DNA
<213> Gordonibacter

<220>
<221> source
<222> 1..114
<223> /organism="Gordonibacter"
      /note="aplicon obtenido usando la sonda y los cebadores uro2 F y
      uro R "
      /mol_type="unassigned DNA"

<400> 10
cgggttccga actggcaggc tcgagtctgg tagaggaaga tggaattccc ggtgtagcgg      60
tggaatgcgc agatatcggg aagaacaccg atggcgaagg cagtcttctg ggcc          114

<210> 11
<211> 167
<212> DNA
<213> Gordonibacter

<220>
<221> source
<222> 1..167
<223> /organism="Gordonibacter"
      /note="aplicon obtenido usando la sonda y los cebadores uro2 F y
      uro2 R "
      /mol_type="unassigned DNA"

<400> 11
cgggttccga actggcaggc tcgagtctgg tagaggaaga tggaattccc ggtgtagcgg      60
tggaatgcgc agatatcggg aagaacaccg atggcgaagg cagtcttctg ggccgcgact      120
gacgctgagg cgcgaaagct gggggagcga acaggattag atacct                    167

<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..19
<223> /organism="Artificial Sequence"
      /note="ARN 16S-616 V"
      /mol_type="unassigned DNA"

```

ES 2 510 216 A1

<400> 12
 agagtttgat ymtggctca 19

<210> 13
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..17
 <223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="ARN 16S-699 R"
 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 13
 agggttgctgc tcgttgc 17

<210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..18
 <223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="ARN 16S-P609 D"
 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 14
 ggmttagata cccbdgta 18

<210> 15
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..17
 <223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="ARN 16S-P1525 R"
 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 15
 waggaggtra tccadcc 17